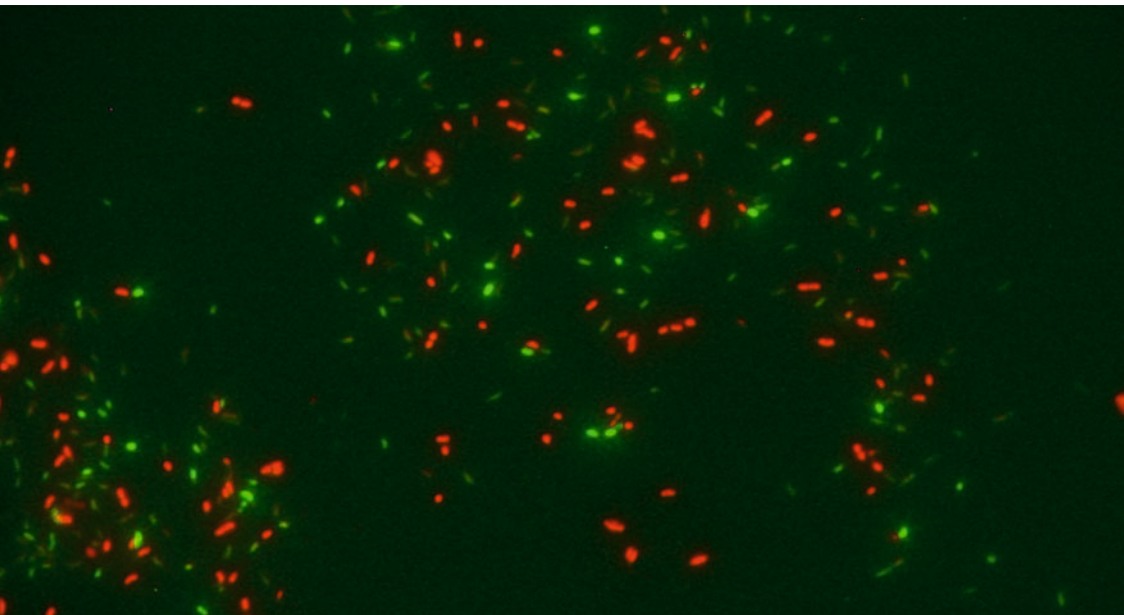


SIMONE SCHILLINGER

Durchflusszytometrischer Nachweis von
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*-
spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Durchflusszytometrischer Nachweis von
Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*-
spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Simone Schillinger

Tierärztin aus Freiburg

Gießen, 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Bauerfeind
Prof. Dr. Michael Bülte

Tag der Disputation: 17.12.2012

Für meine Mutter und Martin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	viii
Veröffentlichungen	xii
I Einleitung.....	1
II Schrifttum	3
1 Die Paratuberkulose des Rindes	3
1.1 Taxonomie und Charakterisierung des Erregers.....	3
1.2 Wirtsspektrum	5
1.3 Übertragung und Anfälligkeit.....	6
1.4 Stadien der MAP-Infektion	7
2 Die MAP-spezifische humorale Immunantwort des Rindes.....	8
2.1 Verlauf der MAP-spezifischen humoralen Immunantwort.....	9
2.2 T _H 1- und T _H 2-assoziierte Antikörpersubtypen	11
2.3 Antigene von MAP und deren Verwendung zum Nachweis MAP- spezifischer Antikörper	13
2.3.1 Antigengemische.....	13
2.3.2 Lipidhaltige Antigene	15
2.3.3 Proteinantigene	16
2.3.3.1 Nachweislich <i>in vitro</i> exprimierte Proteine mit bekannter Funktion oder Lokalisation.....	19
2.3.3.2 Rekombinant hergestellte Proteine ohne nachweisliche Expression <i>in vitro</i>	23
3 Serologische Nachweisverfahren für MAP-Infektionen beim Rind	25
3.1 Komplementbindungsreaktion	25
3.2 Agargelimmunodiffusionstest.....	26
3.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay	26
3.4 Durchflusszytometrie-basierter Antikörpernachweis	33
III Material und Methoden	34
1 Bakterienstämme	34
2 Betriebe.....	35
2.1 MAP-unverdächtige Rinderbetriebe	35
2.2 MAP-Problembetriebe	36

3	Rinder	38
3.1	Kühe	38
3.2	Kälber der experimentellen Infektionsstudie	39
3.3	Kälber der Feldstudien.....	41
3.3.1	Kohortenstudie 1	41
3.3.2	Kohortenstudie 2	41
4	Experimentelle Infektionsstudie	44
5	Serumproben	46
6	Kotproben	46
7	Verbrauchsmaterialien und Lösungen	46
8	Bakteriologische Methoden	46
8.1	Anzucht der Bakterienstämme	46
8.2	Keimzahlbestimmung	49
8.2.1	LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit	49
8.2.2	KbE-Bestimmung und OD ₆₆₀ -Messung	52
8.3	Herstellung der Test- und Präadsorptionsantigene	52
8.4	Herstellung der Inokula und Scheininokula	53
9	Serologische Methoden.....	56
9.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	56
9.1.1	Svanovir®-ELISA	57
9.1.2	Pourquier®-ELISA.....	58
9.1.3	Cattletype®-ELISA	59
9.2	Durchflusszytometrische Antikörper-Tests (DFZM-Ak-Tests).....	60
9.2.1	Etablierung und Optimierung der DFZM-Ak-Tests.....	60
9.2.2	Test- und Präadsorptionsantigene	61
9.2.3	Durchführung der DFZM-Ak-Tests	61
9.2.4	Gating-Strategie und Auswertung der DFZM-Ak-Tests	63
10	Statistische Auswertung	65
IV	Ergebnisse.....	66
1	Identifizierung von MAP-unverdächtigen Betrieben	66
2	Etablierung und Evaluierung der DFZM-Ak-Tests an adulten Rindern.....	69
2.1	Serum- und Sekundärantikörperkonzentrationen.....	69
2.2	MAP-Wachstumsphase	69
2.3	Konzentration der Präadsorptions- und Testantigene	71

2.4	Titerberechnung	74
2.5	Art des Präadsorptionsantigens.....	75
2.6	Vergleichende Untersuchung der Testqualität von DFZM-Ak- Testvarianten und kommerziellen ELISAs	78
3	Etablierung des LIVE/DEAD® BacLight™-Kits.....	82
3.1	Gating-Strategie bei der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse.....	82
3.2	Korrelation der verschiedenen Keimzählmethoden.....	84
4	Ergebnisse der experimentellen Infektionsstudie.....	87
4.1	Ergebnis der Inokulationsdosis-Überprüfung	87
4.2	MAP-Status der Muttertiere	88
4.3	Ergebnis der klinischen Überwachung der Kälber.....	90
4.4	Dynamik MAP-spezifischer Antikörper in der Kontroll- und in der Infektionsgruppe	91
4.5	Dynamik der MAP-spezifischen DFZM-Ak-Titer beim einzelnen Kalb	96
4.6	Antikörpertiter im Pourquoi®-ELISA	102
4.7	Ergebnisse der kulturell-bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchungen	105
5	Ergebnisse der Feldstudien.....	107
5.1	Nachweis MAP-spezifischer maternaler Antikörper bei Kälbern und Jungrindern (Kohortenstudie 1)	107
5.2	Nachweis der MAP-spezifischen Serokonversion bei Jungrindern (Kohortenstudie 2)	113
V	Diskussion	119
VI	Zusammenfassung	145
VII	Summary	147
VIII	Literaturverzeichnis	149
IX	Anhang	173
1	Reagenzien und Materialien.....	173
2	Puffer, Medien und Lösungen	176
3	Geräte.....	178
	Tabellenverzeichnis	179
	Abbildungsverzeichnis	181

Danksagung	183
-------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
ad	auffüllen bis
A. dest.	Aqua destillata
AGIT	Agargelimmunodiffusionstest
Ahp	Alkylhydroperoxid-Reduktase
Ak	Antikörper
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	engl.: area under the curve
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	engl.: cluster of differentiation
DC	Dentritische Zellen
DFZM	Durchflusszytometer
DM	Darmmukosa
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FG	Feuchtgewicht
FITC	Fluoreszein-Isotiozyanat
FSC	engl.: forward scatter
g	Erdschwerebeschleunigung

GPL	Glycopeptidolipide
h	Stunden
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HEYM-Agar	Herrold's Egg Yolk Medium-Agar
HRP	engl.: horseradish-peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN- γ	Interferon- γ
IFTN	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde; Justus-Liebig-Universität Gießen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	Insertionselement
k.A.	keine Angabe
KbE	Koloniebildende Einheit
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilo-Dalton
KWS	Klinik für Wiederkäuer und Schweine; Justus-Liebig-Universität Gießen
LAM	Lipoarabinomannan
LT	Lebenstag
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
M	Molarität (mol/l)
MAA	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MB7H9	Middlebrook 7H9-Medium
MFLI	Mittlere relative Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MGIT	engl.: Mycobacteria growth indicator tube

MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
Mo	Monat
MP	<i>Mycobacterium phlei</i>
M.p.i.	Monate <i>post infectionem</i>
mRNA	engl.: messenger RNA
n	Anzahl unabhängiger Versuche
N ₂	Summenformel des molekularen Stickstoffs
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
OD ₆₆₀	optische Dichte bei 660 nm
OIE	franz.: Office International des Epizooties
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PBMC	engl.: peripheral blood mononuclear cell
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PI	Propidiumjodid
PPA	protoplasmatisches Antigen
PPD	engl.: purified protein derivative
Pq	Pourquier®-ELISA
Präad.	Präadsorption
Q	Quantil
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	engl.: receiver operating characteristic

rpm	engl.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannten
SSC	engl.: side scatter
subsp.	Subspezies
Sv	Svanovir [®] -ELISA
Tab.	Tabelle
TGF	engl.: transforming growth factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T.p.i.	Tage <i>post infectionem</i>
T.p.n.	Tage <i>post natum</i>
W.p.i.	Wochen <i>post infectionem</i>

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster

Fischer, M., Ö. Akineden, A. Abdulmawjood, **S. Schillinger**, T. Seeger und M. Bülte (2008): Kultureller Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Kälberkot. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG, 29.09.-02.10.2008, Garmisch-Partenkirchen.

Akineden, Ö., A. Abdulmawjood, T. Seeger, **S. Schillinger** und M. Bülte (2008): Erfahrungen mit kulturellen Anzuchtverfahren für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rinderkot. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG, 29.09.-02.10.2008, Garmisch-Partenkirchen.

Akineden, Ö., T. Seeger, **S. Schillinger**, A. Abdulmawjood und M. Bülte (2008): Molekularbiologische und kulturelle Untersuchungen auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in einem Milchviehbestand. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der DVG, 29.09.-02.10.2008, Garmisch-Partenkirchen.

Schillinger, S., P.S. Bridger, S. Barth, T. Seeger, Ö. Akineden, R. Bauerfeind, C. Menge (2008): Durchflusszytometrischer Nachweis von Antikörper gegen auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* beim Rind. DVG-Fachgruppentagung „Bakteriologie und Mykologie“ 25.-27.06.2008, Braunschweig. Abstract in Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 121, Heft 11/12 (2008), Seiten 385-460.

Schillinger, S., P.S. Bridger, S. Barth, Ö. Akineden, T. Seeger, C. Menge, R. Bauerfeind (2009): Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern mit Hilfe der Durchflusszytometrie. 7. Stendaler Symposium zu BHV-1, BVD-, BTV- und Paratuberkulose-Bekämpfung, 11.-13.03.09, Stendal.

Schillinger, S., P.S. Bridger, S. Barth, Ö. Akineden, T. Seeger, C. Menge, R. Bauerfeind (2009): Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Sommerversammlung des Vereins der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 20.06.2009, Gießen.

Schillinger, S., P.S. Bridger, T. Seeger, Ö. Akineden, C. Menge, R. Bauerfeind (2009): Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Blut von Rindern mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Nationales Symposium für Zoonosenforschung, 07.-08.10.2009, Berlin.

Fischer, M., Ö. Akineden, A. Abdulmawjood, **S. Schillinger**, T. Seeger, M. Bülte (2009): Erste Erfahrungen mit dem Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus Kälbern. 50. Arbeitsgruppentagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“, 29.09.-02.10.2009, Garmisch-Partenkirchen.

Schillinger, S., P.S. Bridger, M. Fischer, Ö. Akineden, T. Seeger, C. Menge, R. Bauerfeind (2010): Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern. Verein der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 18.06.2010, Gießen.

Schillinger, S., P.S. Bridger, M. Fischer, Ö. Akineden, T. Seeger, C. Menge, R. Bauerfeind (2010): Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) bei Rindern. DVG-Fachgruppentagung „Bakteriologie und Mykologie“ 22.-24.06.2010, Jena.

Fischer, M., Ö. Akineden, A. Abdulmawjood, P.S. Bridger, **S. Schillinger**, T. Seeger, M. Bülte (2010): Mikrobiologischer und molekularbiologischer Nachweis *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) bei Kälbern. DVG-Fachgruppentagung „Bakteriologie und Mykologie“ 22.-24.06.2010, Jena.

Bridger, P.S., H. Bulun, **S. Schillinger**, T. Seeger, M. Fischer, R. Bauerfeind, C. Menge (2010): CD4⁺ T-cells dominate the early immune response in calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 22.-25.09.2010, Leipzig.

Schillinger, S., P.S. Bridger, M. Fischer, Ö. Akineden, T. Seeger, C. Menge, R. Bauerfeind (2010): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)-specific antibodies in cattle via flow cytometry. National Symposium on Zoonoses Research, 7.-8.10.2010, Berlin.

Schillinger, S., P.S. Bridger, M. Fischer, Ö. Akineden, T. Seeger, C. Menge, R. Bauerfeind (2011): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)-specific antibodies in cattle via flow cytometry. Verein der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 17.06.2011, Gießen.

Bridger, P.S., H. Bulun, **S. Schillinger**, T. Seeger, M. Fischer, R. Bauerfeind, C. Menge (2011): CD4⁺ T-cells dominate the early immune response in calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Verein der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 17.06.2011, Gießen.

Fischer, M., Ö. Akineden, A. Abdulmawjood, K. Doll, **S. Schillinger**, M. Bülte (2011): Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in minimal-invasiv entnommenen Lymphknoten aus natürlich infizierten Kälbern. Verein der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 17.06.2011, Gießen.

Fischer, M., Ö. Akineden, A. Abdulmawjood, K. Doll, **S. Schillinger**, M. Bülte (2011): Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in minimal-invasiv entnommenen Lymphknoten aus natürlich infizierten Kälbern. 52. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene“ der DVG, 27.-30.09.2011, Garmisch-Partenkirchen.

Schillinger, S., P.S. Bridger, T. Seeger, M. Fischer, C. Menge, R. Bauerfeind (2011): Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bei Kälbern und Jungrindern mit der Durchflusszytometrie. 3. Tagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft im Rahmen des 57. Jahreskongresses der DGK-DVG, 11.-12.11.2011, Berlin.

Schillinger, S., P.S. Bridger, T. Seeger, M. Fischer, C. Menge, R. Bauerfeind (2012): Erregerspezifische Antikörper als Indikatoren der MAP-Infektion bei Kälbern und Jungrindern. 7. Stendaler Symposium zu BHV-1, BVD-, BTV- und Paratuberkulose-Bekämpfung, 09.-11.05.12, Stendal.

Vorträge

Menge, C., R. Bauerfeind, A. Abdulmawjood, Ö. Akineden, M. Fischer, T. Seeger, F. Schiffmann, P.S. Bridger, **S. Schillinger**, H. Bulun, K. Doll, M. Bülte (2009): Neue Ansätze für die Frühdiagnostik der bovinen MAP-Infektion. 7. Stendaler Symposium zu BHV-1, BVD-, BTV- und Paratuberkulose-Bekämpfung, 11.-13.03.2009, Stendal.

Bridger, P.S., **S. Schillinger**, H. Bulun, R. Bauerfeind, C. Menge (2009): Neue Wege der indirekten Infektionsdiagnostik bei der Paratuberkulose des Rindes. 4. Arbeitsgruppentagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, 13.-14.05.2009, Jena.

Menge, C., R. Bauerfeind, A. Abdulmawjood, Ö. Akineden, M. Fischer, H. Wagner, T. Seeger, P.S. Bridger, **S. Schillinger**, H. Bulun, K. Doll, M. Bülte (2009): Neue Ansätze für die Frühdiagnostik der bovinen MAP-Infektion. Nationales Symposium für Zoonosenforschung, 07.-08.10.2009, Berlin.

Bridger, P.S., **S. Schillinger**, H. Bulun, R. Bauerfeind und C. Menge (2009): Neue Aspekte der immunologischen Paratuberkulose-Diagnostik beim Rind. 2. Jahrestagung der Deutschen Buiatrischen Gesellschaft der DVG, 13.-14.11.09, Berlin. Abstract in Vet-MedReport, Sonderausgabe V9, 33. Jahrgang 2009, Seite 3.

Schillinger, S. (2009): Flow Cytometry - A suitable method for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) specific antibodies in cattle? Current Topics in Infection Biology, GGL Curriculum, 01.12.2009, Gießen.

Lück, S., W. Herbst, **S. Schillinger**, K. Doll (2010): Paratuberkulose-Antikörper bei Klinikpatienten. Münchner Buiatrik-Tagung, 05.-07.02.2010, München.

Patentanmeldung

Bauerfeind, R., C. Menge, S. Schillinger, S. Barth, P.S. Bridger (2009): Method for the specific detection of MAP antibodies. PCT/EP2009/057976. WO/2009/156475.

Die Förderung dieser Doktorarbeit erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Förderkennzeichen 28-1-32.006.-06.

I Einleitung

Paratuberkulose ist eine chronische Darmerkrankung der Wiederkäuer, die vor allem durch eine progrediente, granulomatöse Entzündung der Dünndarmwand gekennzeichnet ist. Verursacht wird diese Krankheit durch das Bakterium *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Rinder infizieren sich meist innerhalb der ersten Lebenswochen durch Aufnahme des Erregers über mit infektiösem Kot kontaminiertes Kolostrum oder kontaminierter Milch, eine intrauterine Übertragung des Erregers ist jedoch auch möglich (Whittington und Windsor, 2007). Klinische Symptome werden frühestens bei Rindern im Alter von über 2 Jahren beobachtet, in der Regel aber erst ab einem Alter von 4 bis 6 Jahren (Tiwari *et al.*, 2006). MAP-infizierte Tiere beginnen den Erreger aber bereits während der langen Inkubationszeit intermittierend mit dem Kot auszuscheiden. Damit werden sie zur Ansteckungsquelle für weitere Rinder, bleiben dem Tierhalter als solche aber aufgrund der fehlenden Krankheitszeichen verborgen. Zur Sanierung von infizierten Herden bzw. zur Paratuberkulose-Prophylaxe in den Beständen ist es deshalb wichtig, infizierte Tiere in einem möglichst frühen Stadium der Infektion zu erkennen und aus der Herde zu entfernen.

Der Goldstandard der Paratuberkulose-Diagnostik ist das direkte Verfahren zum Erregernachweis mittels kulturell-bakteriologischer Untersuchung von Rinderkot. Die Nachteile dieser Methodik liegen in der Langwierigkeit der Erregeranzucht (mindestens 6 bis 12 Wochen) und in der Häufigkeit falsch negativer Befunde, da der Erreger in der frühen Phase der Infektion noch nicht oder nur intermittierend ausgeschieden wird (McDonald *et al.*, 1999). Neben Methoden zum direkten Nachweis von MAP existieren verschiedene Diagnostika, die auf den Nachweis einer MAP-spezifischen Immunantwort eines Tieres abzielen. Wegen ihrer schnellen und kostengünstigen Durchführung werden zur Herdendiagnostik heute in der Regel Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) verwendet, mit welchen man MAP-spezifische Antikörper nachweisen kann. Die derzeit erhältlichen ELISAs weisen jedoch bei Tieren über 2 Jahren eine niedrige Sensitivität von nur 17 % bis 56 % auf (Nielsen und Toft, 2006).

Die geringe Sensitivität der ELISAs ist auf eine Besonderheit in der Pathogenese von MAP zurückzuführen. Während die klinisch inapparente Phase zu Beginn des Infektionsverlaufes von zellulären Immunmechanismen dominiert wird, ist die humorale Immunantwort nur schwach bzw. noch nicht ausgebildet. Aus diesem Grund sind für diesen Zeitraum sensitivere Antikörper-Nachweisverfahren erforderlich als die aktuellen ELISA-Systeme. Eda *et al.* (2005) entwickelten ein auf der Durchflusszytometrie (DFZM) basierendes serologisches Verfahren, mit welchem MAP-

spezifisches IgG in Kälbern schon ab dem 170. Tag nach experimenteller Infektion nachweisbar war. Auch bei natürlich infizierten adulten Rindern war die von Eda etablierte DFZM-Methode im Vergleich zu einem kommerziellen ELISA sensitiver. Da bei dieser DFZM-Methode MAP-Bakterien mit intakter Zelloberfläche verwendet werden, könnten allerdings Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien die Spezifität dieses Tests herabsetzen. Andererseits scheinen in den verschiedenen Infektionsstadien einer MAP-Infektion unterschiedliche Immunglobulinsubtypen eine Rolle zu spielen (Koets et al., 2001; Estes und Brown, 2002); somit könnte die differenzierte Quantifizierung MAP-spezifischer Antikörper nach ihrer Zugehörigkeit zu den Immunglobulinsubtypen die Sensitivität des Tests verbessern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DFZM-Methode von Eda *et al.* (2005) deshalb im Labor etabliert und weiterentwickelt. Dabei wurde untersucht, ob diese als „Durchflussszytometrische Antikörpertests“ (DFZM-Ak-Tests) bezeichneten Diagnostika eine Alternative zu den kommerziell erhältlichen ELISAs darstellen. Im Einzelnen sollten Antworten auf die folgenden Fragen gegeben werden:

- Können die Präadsorption der Serumproben und die Verwendung verschiedener Immunglobulinsubtypen die Sensitivität und Spezifität der DFZM-Ak-Tests verbessern?
- Sind die DFZM-Ak-Tests sensitiver als kommerziell erhältliche ELISAs?
- Ab welchem Zeitpunkt sind MAP-spezifische maternale Antikörper kolostralen Ursprungs in Kälbern nicht mehr nachweisbar?
- Ab welchem Zeitpunkt ist eine Serokonversion bei MAP-infizierten Kälbern und Jungrindern mittels DFZM-Ak-Tests nachweisbar?

II **Schrifttum**

1 **Die Paratuberkulose des Rindes**

1.1 **Taxonomie und Charakterisierung des Erregers**

Mycobacterium (M.) avium subsp. *paratuberculosis* gehört zur Ordnung der *Actinomycetales* und dort der Familie der *Mycobacteriaceae* an. Die Spezies *M. avium* umfasst 4 Subspezies: *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *silvaticum* und *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mijs *et al.*, 2002; Biet *et al.*, 2008; Turenne *et al.*, 2008). *M. avium* wird gemeinsam mit *M. intracellulare* zum *Mycobacterium avium*-Komplex zusammengefasst, wobei *M. intracellulare* eine eigene Spezies darstellt (Saito *et al.*, 1989; Turenne *et al.*, 2006).

MAP ist ein säurefestes, unbewegliches, obligat aerobes, schwach grampositives, 0,5 bis 1,5 µm langes Stäbchenbakterium, das zu den fakultativ intrazellulären Erregern zählt. Bevorzugte Wirtszellen sind Makrophagen, in denen MAP überleben und sich vermehren kann, indem es die Phagosomen-Lysosomenfusion hemmt. Eine weitere Besonderheit von MAP stellt die lipidreiche Zellwand des Erregers dar. Diese besteht aus einer inneren Peptidoglykanschicht, welche mit Arabinogalactanen gekoppelt ist, einer mittleren Schicht von Mycolsäuren und einer äußeren vorwiegend aus Peptidoglycolipiden bestehenden Schicht (Clarke, 1997). Aufgrund dieser spezifischen Zellwandstruktur verfügt MAP über eine hohe Tenazität gegenüber Trockenheit, saurem Milieu und vielen Desinfektionsmitteln (Chiodini *et al.*, 1984).

Innerhalb der Gattung *Mycobacterium* werden schnell und langsam wachsende Spezies unterschieden. Zu den langsam wachsenden Arten gehören bedeutende Krankheitserreger wie *M. leprae*, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, MAA und MAP (Stahl und Urbance, 1990). Mit einer Generationszeit von 1,3 bis 4,4 Tagen (gemessen in Flüssignährmedium) ist ein Koloniewachstum von MAP auf festem Nährboden makroskopisch frühestens nach 6 bis 10 Wochen wahrzunehmen (Lambrecht *et al.*, 1988). Das Wachstum von MAP *in vitro* ist von Mycobactin J abhängig. Mycobactin ist ein zellwandassoziiertes Siderophor, mit dem das Bakterium das für seine Vermehrung essentielle Eisen aus der Umgebung aufnimmt. Obwohl die Mycobactin-Abhängigkeit auch bei einigen anderen Stämmen des *Mycobacterium avium*-Komplexes (u.a. MAA-Serotypen 1-3) vorkommen kann, wurde dieses Kriterium lange Zeit zur Identifizierung von MAP verwendet (Matthews *et al.*, 1978; Thorel, 1984; Thorel *et al.*, 1990). Ein Mycobactin-unabhängiges Wachstum von MAP *in vitro* kann bei niedrigen pH-Werten

und einer hohen Eisenkonzentration des Mediums beobachtet werden (Barclay *et al.*, 1985; Lambrecht und Collins, 1992; Aduriz *et al.*, 1995). *In vivo* scheint der in den Phagolysosomen vorherrschende saure pH-Wert und die Fähigkeit von MAP, niedermolekulare Eisenchelatbildner (Exocholine) zu produzieren, ein Mycobactin-unabhängiges Wachstum zu ermöglichen (Barclay und Ratledge, 1983; Lambrecht und Collins, 1993). Ein weiteres Merkmal von MAP in Flüssignährmedium ist die Neigung zur Klumpenbildung, die durch interbakterielle Filamente begünstigt wird (Merkal, 1973).

Das Genom des MAP K10-Stammes wurde von der Arbeitsgruppe Li *et al.* im Jahre 2005 vollständig sequenziert (Genbank Nr. NC002944). Das Genom ist sehr reich an GC (69 Mol%), 4,83 Mb groß und beinhaltet bis zu 4587 Gene. Bisher konnte in MAP, im Gegensatz zu anderen Mykobakterien, keine Plasmid-DNA nachgewiesen werden (Harris und Barletta, 2001). Das Insertionselement IS900, welches in 14 bis 20 identischen Kopien über das bakterielle Chromosom verteilt ist, stellt ein weiteres Charakteristikum von MAP dar. Der Nachweis von IS900 wird sowohl zur genotypischen Differenzierung als auch zum molekularbiologischen Erregernachweis sowie zur MAP-Identifizierung eingesetzt (Collins *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1989; Vary *et al.*, 1990; Moss *et al.*, 1991). Cousins *et al.* (1999) und Englund *et al.* (2002) konnten jedoch zeigen, dass IS900-ähnliche Sequenzen im Genom von *M. cookii* und *M. scrofulaceum*, welche zur normalen Bodenmikrobiota gehören, zu falsch-positiven Ergebnissen in der molekularbiologischen Diagnostik führen können. Als weitere gut geeignete Zielregionen für den spezifischen MAP-Nachweis wurden insbesondere ISMav2 und F57 beschrieben (Poupart *et al.*, 1993; Strommenger *et al.*, 2001; Vansnick *et al.*, 2004).

Im Vergleich zu anderen Bakterien weisen die verschiedenen MAP-Isolate eine geringe genetische Diversität auf (Motiwala *et al.*, 2003). Anhand von Wachstumseigenschaften, Pigmentation und modernen Typisierungsverfahren [u.a die Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus der IS900-tragenden DNA-Fragmente (RFLP-IS900)] können die MAP-Isolate derzeit jeweils einer von 3 Gruppen zugeordnet werden: dem Schaf-Typ (Typ I), dem Rind-Typ (Typ II) oder dem Intermediär-Typ (Typ III) (Collins *et al.*, 1990; Pavlik *et al.*, 1999). Die Typen I und II zeigen eine starke Präferenz zu dem jeweiligen Wirt, kommen jedoch nicht exklusiv dort vor (Collins *et al.*, 1990; Stevenson *et al.*, 2002).

1.2 Wirtsspektrum

Paratuberkulose ist eine Erkrankung der Wiederkäuer. Neben den Hauswiederkäuern wie Rind, Schaf und Ziege können sich auch Wild- und Zoowiederkäuer mit MAP infizieren und die typischen klinischen Symptome entwickeln (Clarke, 1997; Buergelt *et al.*, 2000; Machackova *et al.*, 2004). Außerdem konnte der Erreger in Wildkaninchen und anderen Wildtieren nachgewiesen werden, die zum Teil auch Paratuberkulose-ähnliche, histologische Veränderungen in den Mesenteriallymphknoten und/oder jejunale Peyersche Platten aufwiesen (Beard, 1999; Greig *et al.*, 1999; Beard *et al.*, 2001; Beard *et al.*, 2001). In einer Studie von Beard *et al.* (2001) wurden Kälber mit einem MAP-Stamm inokuliert, welcher aus wild lebenden Kaninchen isoliert worden war. Nach 6 Monaten war MAP in den Mesenteriallymphknoten und/oder den jejunalen Peyerschen Platten aller 8 Kälber dieses Versuchs kulturell nachweisbar. Bei 5 Kälbern konnte MAP mittels Kotkultur festgestellt werden. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass Wildtiere als MAP-Reservoir für die Verbreitung der Paratuberkulose bedeutsam sind (Daniels *et al.*, 2001; Daniels *et al.*, 2003). Trotz der molekularbiologischen Unterschiede zwischen Rinder- und Schafisolaten konnten Kälber mit einem MAP-Stamm vom Schaf-Typ experimentell infiziert werden (Stewart *et al.*, 2007). Klinische Symptome traten während der Beobachtung über 18 bzw. 35 Monaten *post infectionem* jedoch bei keinem Kalb auf.

Auch bei nicht-menschlichen Primaten wurde eine natürliche Infektion mit MAP dokumentiert (McClure *et al.*, 1987). In einer in Gefangenschaft lebenden Kolonie von 38 Stumpfschwanzmakaken wurde bei 29 Tieren MAP im Kot nachgewiesen, die Infektionsquelle blieb unbekannt. Fast die Hälfte der Tiere ($n = 13$) starb an chronischer Diarrhoe und Kachexie. In der pathohistologischen Untersuchung zeigten diese Tiere die für Paratuberkulose typischen Veränderungen an der Darmwand und in den Darmlymphknoten.

Morbus Crohn (MC) ist eine beim Menschen auftretende chronische, granulomatöse Ileocolitis, die aufgrund ähnlicher Symptomatik schon seit Anfang des vorigen Jahrhunderts mit der Paratuberkulose des Rindes in Verbindung gebracht wird (Crohn *et al.*, 1952; Grant, 2005). MAP konnte sowohl aus veränderten Darmabschnitten von MC-Patienten als auch im Stuhl und Darmgewebe von gesunden Menschen kulturell und mittels PCR (IS900) nachgewiesen werden (Tuci *et al.*, 2011). Allerdings war ein Nachweis von MAP in veränderten Darmabschnitten nicht bei allen MC-Patienten möglich (Fujita *et al.*, 2002; Baksh *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 2004). Andererseits wurde MAP auch in Blut- und Muttermilchproben einiger MC-Patienten direkt nachgewiesen (Collins *et al.*, 2000; Naser *et al.*, 2004; Biet *et al.*, 2011). Naser *et*

al. (2000) detektierten MAP-spezifische Antikörper in 80 von 89 (89 %) MC-Patienten, dagegen nur bei 7 von 50 (14 %) gesunden Probanden. Anhand der bisher durchgeführten Studien konnte der kausale Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn bis heute nicht eindeutig geklärt werden (Rosenfeld und Bressler, 2011; Singh und Gopinath, 2011).

1.3 Übertragung und Anfälligkeit

Die Erregerausbreitung innerhalb eines Bestandes erfolgt vorwiegend über den fäkal-oralen Infektionsweg (Clarke, 1997). Die Menge des Erregers im Kot infizierter Tiere kann bis zu 10^8 KbE/g Kot erreichen, die tägliche Ausscheidungsmenge von MAP kann mehr als 10^{12} KbE pro Tier betragen (Cocito *et al.*, 1994). Neben der Ausscheidung über den Kot findet man den Erreger auch in Milch und Kolostrum (Taylor *et al.*, 1981; Streeter *et al.*, 1995; Millar *et al.*, 1996). Bei asymptomatischen Ausscheidern wurde MAP in der Milch mit einer Menge von 2 bis 8 KbE/50 ml nachgewiesen (Sweeney *et al.*, 1992; Ellingson *et al.*, 2005). Des Weiteren war der Erreger auch in Sperma, Uterusspülflüssigkeit und Urin aufzufinden (Larsen *et al.*, 1981; Rohde und Shulaw, 1990). Der Nachweis des Erregers gelang auch im Blut und vielen anderen Organen wie Leber, Milz, Nieren und Genitalorganen (Larsen *et al.*, 1981; Hines *et al.*, 1987; Pavlik *et al.*, 2000; Barrington *et al.*, 2003; Buergelt und Williams, 2004).

Die Infektion mit MAP erfolgt überwiegend im Kälberalter über die Aufnahme des Erregers aus der mit Kot kontaminierten Umwelt oder direkt über erregerhaltiges Kolostrum (Streeter *et al.*, 1995). Die intrauterine Übertragung des Erregers gilt mittlerweile ebenfalls als gesichert (Whittington und Windsor, 2007). Whittington und Windsor (2007) zeigten, dass in den USA 9 % der Feten von klinisch unauffälligen Kühen und 39 % der Feten von an Paratuberkulose erkrankten Kühen mit MAP infiziert sind. Seitz *et al.* (1989) untersuchten ebenfalls Feten von Paratuberkulose-kranken Kühen auf das Vorhandensein von MAP. Bei 26,4 % der Feten wurde MAP in den Darmlymphknoten kulturell-bakteriologisch nachgewiesen.

Kälber, die jünger als 30 Tage sind, scheinen für die MAP-Infektion am anfälligsten zu sein (Larsen *et al.*, 1975; Clarke, 1997). Rinder über 2 Jahre gelten als weitgehend resistent. Grundsätzlich ist eine Infektion mit MAP jedoch in allen Altersstufen möglich (Windsor und Whittington, 2009).

Das klinische Bild der Paratuberkulose scheint bei den Rassen Jersey oder Guernsey im Vergleich zu anderen Rassen häufiger aufzutreten (Cetinkaya *et al.*, 1997). In einer Studie von Jakobsen *et al.* (2000) waren im Vergleich zu anderen Rassen signifikant mehr Jersey-Rinder in einem Paratuberkulose-ELISA seropositiv. In

der Literatur wird die Heritabilität (h^2) der MAP-Infektion auf 0,06 bis 0,18 geschätzt (Koets *et al.*, 2000; Gonda *et al.*, 2006; Hinger *et al.*, 2008). Beim Menschen erhöht eine Mutation des auf dem Chromosom 16 lokalisierten *CARD15*-Gens das Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken (Hampe *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001). Nach Untersuchungen von Pinedo *et al.* (2008), scheinen beim Rind Mutationen innerhalb des *CARD15*-Gens die Anfälligkeit für MAP-Infektionen zu erhöhen. *CARD15* (Caspase Recruitment Domain, Member 15) ist ein zytoplasmatisches Protein, das in peripheren Blutmonozyten und intestinalen Epithelzellen und Leukozyten exprimiert wird und die Abwehr gegen mikrobielle Pathogene vermittelt (Berrebi *et al.*, 2003).

1.4 Stadien der MAP-Infektion

Der Verlauf einer MAP-Infektion beim Rind kann anhand klinischer Symptome, pathomorphologischer Veränderungen sowie der Erregermenge im Kot in 4 Stadien (Stadien I bis IV) unterteilt werden (Barrington *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2006). Des Weiteren werden die Begriffe klinisch inapparentes (umfasst Stadien I und II) und klinisches Stadium (umfasst Stadien III und IV) verwendet. Die Stadien I und II entsprechen der Inkubationszeit.

Stadium I. Dieses Stadium umfasst die frühe Phase der Infektion und wird auch als „stille“ Infektion bezeichnet, da das Ausscheiden des Erregers über den Kot nicht nachgewiesen werden kann und keine klinische Anzeichen der Infektion vorhanden sind (Tiwari *et al.*, 2006). Das Stadium I dauert in der Regel mindestens 2 Jahre. Bisher ist der Nachweis einer Infektion in diesem Stadium nur durch die Untersuchung von Darmgewebe oder Darmlymphknoten mit aufwändigen kulturellen oder histologischen Methoden möglich (Whitlock und Buerge, 1996).

Stadium II. Das Stadium II ist dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere noch immer keine Symptome aufweisen, der Erreger jedoch (meist intermittierend) mit dem Kot ausgeschieden wird (Sweeney *et al.*, 1992; Coussens, 2001). Bei der pathologischen Untersuchung werden makroskopisch erste Anzeichen einer leichten Enteritis, gering- bis mittelgradige Darmschleimhauthypertrophien und vergrößerte Mesenteriallymphknoten vorgefunden (Brady *et al.*, 2008).

Stadium III. Das Stadium III beginnt mit den ersten Symptomen der Paratuberkulose. Aufgrund der langen Inkubationszeit tritt dieses Stadium grundsätzlich erst 4 bis 6 Jahre nach Erstinfektion auf (Tiwari *et al.*, 2006). Infolge einer hämatogenen und lymphogenen Streuung kann MAP neben dem Darmgewebe und – lymphknoten auch in anderen Organen wie in Niere, Leber, Milz, Lunge und Körperlymphknoten nachgewiesen werden (Hines *et al.*, 1987). In den betroffenen Organen

kommt es zur Bildung fokaler, granulomatöser Entzündungsherde mit einer massiven Infiltration von Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen vom Langhansschen Typ (Clarke, 1997). Makroskopisch ist die Schleimhaut der betroffenen Darmabschnitte hirnwindungsartig verdickt (Dahme und Weiss, 1999). Am stärksten betroffen ist das distale Ileum bis zur Ileocaecalklappe (Büergel *et al.*, 1978). Aus der diffus granulomatösen Entzündung der Darmwand resultiert eine Enteropathie mit stark eingeschränkter Resorptions- und Sekretionsleistung der betroffenen Darmabschnitte. Der entzündlich bedingte Funktionsverlust der Dünndarmschleimhaut äußert sich in Hypoproteinämie, intermittierendem, wässrigem Durchfall, fortschreitendem Gewichtsverlust bei erhaltener Fresslust, Reduktion der Milchleistung und verminderter Fruchtbarkeit (Cocito *et al.*, 1994). Stressfaktoren wie Trächtigkeit, Abkalbung, hohe Milchproduktion und mangelnde Ernährung können den Übergang von Stadium II zu Stadium III beschleunigen (Rankin, 1962; Allen *et al.*, 1968).

Stadium IV. Das letzte Stadium wird auch als „Endstadium“ bezeichnet und schließt sich ohne klaren Übergang an das Stadium III an. Von einigen Autoren werden die Stadien III und IV auch zu einem Stadium zusammengefasst (Cocito *et al.*, 1994). Stadium IV umfasst den Höhepunkt der klinischen Manifestation mit massiven klinischen Symptomen einschließlich Kachexie und endet mit dem Tod des Tieres. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch diffuse Ödeme, insbesondere an Triel und Unterkiefer, hochgradige Kachexie und gestörtes Allgemeinbefinden (Coussens, 2001).

2 Die MAP-spezifische humorale Immunantwort des Rindes

Für die erfolgreiche Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger ist die erworbene, zelluläre Immunantwort des infizierten Wirtsorganismus essentiell (Stabel, 2000b). Aber auch Antikörper können zum Schutz gegen intrazelluläre Bakterien beitragen, indem sie zum beispielsweise durch Opsonisierung und Komplementaktivierung die Elimination des Erregers fördern (Zhao *et al.*, 2006; Shannon *et al.*, 2009). Zu ihrer vollständigen Aktivierung benötigen B-Zellen neben der Bindung des Antigens an den B-Zellrezeptor eine Kostimulation durch T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2-Zellen) (Tizard, 2009). Die von T_H2-Zellen produzierten Zytokine [u.a. Interleukin (IL)-4] führen zur klonalen Expansion erregerspezifischer B-Zellen und zu ihrer Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen. Gleichzeitig wird die Proliferation der T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen) gehemmt (Snapper und Paul, 1987; Mond *et al.*, 1995). T_H1-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine [u.a. Interferon (IFN)-

γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α und IL-2], welche vor allem die zelluläre Immunantwort fördern, jedoch gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf T_H2 -Zellen besitzen (Coussens, 2001). Aufgrund dieser, durch entsprechende Zytokine vermittelten, gegenseitig hemmenden Wirkung der T_H1 - und T_H2 -Zellen, kann eine Immunantwort von nur jeweils einem T-Helferzellsubtyp dominiert werden, man spricht dann von einer T_H1 - bzw. T_H2 -Antwort (Abbas *et al.*, 1996). Des Weiteren haben die T_H1 - bzw. T_H2 -assoziierten Zytokine Einfluss auf die von B-Zellen gebildeten Antikörpersubtypen (Brown *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998).

Über die Rolle der B-Zellen und die protektive Wirkung der gebildeten Antikörper im Verlauf einer MAP-Infektion ist bisher nur wenig bekannt. Studien mit *M. tuberculosis* zeigten, dass B-Zellen am Infektionsgeschehen beteiligt sind. So wurde in B-Zell-defizienten Mäusen nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* eine 3- bis 6-fach höhere Anzahl des Erregers in verschiedenen Organen nachgewiesen als in Organen der infizierten, nicht-B-Zell-defizienten Mäuse der Kontrollgruppe (Vordermeier *et al.*, 1996). Die Verabreichung monoklonaler Antikörper gegen definierte Zielstrukturen von *M. tuberculosis* (z.B. Kapselantigen, Heparin-bindendes Hämagglutinin, Maltose-Bindungsprotein 83) an mit *M. tuberculosis* infizierte Mäuse reduzierte die Erregermenge in verschiedenen Organen und milderte sowohl die Krankheitssymptome als auch die histopathologisch nachweisbaren Schäden (Teitelbaum *et al.*, 1998; Pethe *et al.*, 2001; Chambers *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2004).

2.1 Verlauf der MAP-spezifischen humoralen Immunantwort

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird MAP oral aufgenommen und gelangt mit dem Nahrungsbrei in den Dünndarm. Über die Peyerschen Platten des Ileums und Jejunums lokalisierten M-Zellen kann MAP das Darmepithel überwinden (Chiodini *et al.*, 1984; Momotani *et al.*, 1988; Sigurethardottir *et al.*, 2004). Nach der basolateralen Freisetzung des Erregers aus den M-Zellen wird dieser durch sub- und intraepitheliale Makrophagen sowie Dendritische Zellen (DCs) phagozytiert. MAP ist in der Lage die normale Phagosomen-Lysosomenfusion zu hemmen, wodurch er intrazellulär in diesen professionellen Fresszellen überleben und sich sogar vermehren kann (Tooker *et al.*, 2002). MAP-infizierte bovine Makrophagen sezernieren Zytokine [u.a. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12], welche T-Zellen und weitere Makrophagen aktivieren (Coussens *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2004). Die $CD4^+$ T-Zellen, die in der frühen Phase der Infektion aktiviert werden, gehören vorwiegend zu den T_H1 -Zellen. Das von den T_H1 -Zellen sezernierte proinflammatorische Zytokin IFN- γ wirkt auf die T_H2 -Zellen hemmend, so dass im klinisch inapparenten Stadium einer MAP-Infektion beim Rind

die T_H1 -Antwort dominiert (Snapper und Paul, 1987; Koo *et al.*, 2004). In der frühen Phase der Infektion sind daher mit den derzeit erhältlichen serologischen Nachweissystemen keine MAP-spezifischen Antikörper messbar (Tiwari *et al.*, 2005). In Kälbern, die experimentell mit dem MAP-Stamm K10 infiziert wurden, konnte frühestens 134 Tage nach der MAP-Inokulation ein Anstieg des MAP-spezifischen Antikörpertiters beobachtet werden (Waters *et al.*, 2003). In der frühen Phase der Infektion zeigten experimentell mit MAP infizierte Schaflämmer ($n = 8$) im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolllämmern eine signifikante Reduktion der B-Zellen und einen Abfall der IL-4-mRNA in den Mesenteriallymphknoten und den Peyerschen Platten des Ileums (Begara-McGorum *et al.*, 1998).

Werden die intrazellulär lokalisierten MAP-Bakterien von den Effektoren der angeborenen oder erworbenen zellulären Immunität nicht gehemmt oder eliminiert, vermehren sie sich intrazellulär, was einerseits den Zelltod und die Freisetzung des Erregers nach sich zieht, andererseits aber zur Stimulierung der humoralen Immunantwort führt (Sohal *et al.*, 2008). Die Immunantwort beim Rind im Stadium II ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der proinflammatorischen T_H1 -Antwort und eine zunehmende T_H2 -Antwort (Stabel, 2000a). Die Mechanismen für diesen Wechsel sind nicht vollständig geklärt. Khalifeh und Stabel (2004) zeigten, dass in klinisch inapparent infizierten Rindern IL-10 in Darmgewebe und -lymphknoten hochreguliert wird, was vermutlich zu einer verminderten Freisetzung von IFN- γ führt. In klinisch kranken Rindern ist im Vergleich zur MAP-negativen Kontrollrindern jedenfalls weniger IFN- γ -mRNA in den Darmläsionen und -lymphknoten zu finden (Coussens *et al.*, 2004). Vermutlich sind regulatorische T-Zellen durch die vermehrte Bildung von IL-10 und TGF (transforming growth factor)- β in der Lage T_H1 -Zellen zu inhibieren und somit eine T_H2 -Antwort zu fördern (Coussens *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2008). So reagieren klinisch inapparent infizierte Tiere jenseits des Kälberalters in 20 bis 54 % der Fälle in kommerziell erhältlichen ELISAs auf MAP-spezifische Antikörper positiv (Billman-Jacobe *et al.*, 1992; Köhler *et al.*, 2008). Dabei korreliert der MAP-spezifische Antikörpertiter in diesem Stadium mit der im Kot ausgeschiedenen MAP-Keimzahl und lässt somit Rückschlüsse auf das Fortschreiten der Infektion zu (Sweeney *et al.*, 1995; Kalis *et al.*, 2002).

Die Immunantwort im klinischen Stadium der MAP-Infektion des Rindes wird überwiegend von T_H2 -Zellen im peripheren Blut dominiert (Stabel, 2000a). T_H2 -Zellen und deren Zytokine (z.B. IL-4, IL-5, IL-10) haben eine antiinflammatorische Wirkung und wirken dem Entzündungsgeschehen entgegen (Abbas *et al.*, 1996). Der Übergang der proinflammatorischen T_H1 -Antwort zur T_H2 -Antwort ist meist mit dem Fortschreiten der Krankheit verbunden (Stabel, 2000b; Coussens, 2004). Dies erklärt, warum man

mit den ELISA bei 77 bis 90 % der Rinder im klinischen Stadium MAP-spezifische Antikörper nachweisen kann (Billman-Jacobe *et al.*, 1992; Köhler *et al.*, 2008). Rinder im klinischen Stadium hatten im Vergleich zu Rindern im klinisch inapparenten Stadium zwar einen höheren Anteil an erregerspezifischen B-Zellen im peripheren Blut (Waters *et al.*, 1999; Stabel und Khalifeh, 2008). Aber die B-Zellen aus dem peripheren Blut von Rindern im klinisch inapparenten Stadium zeigten im Vergleich zu Rindern im klinischen Stadium nach einem *in vitro*-MAP-spezifischen Antigenstimulus eine 6,5-mal höhere Proliferationsrate (Waters *et al.*, 1999). Waters *et al.* (1999) vermuteten, dass im klinischen Stadium entweder MAP-spezifische antikörperproduzierende Plasmazellen aus dem peripheren Blut ins Gewebe abwandern oder ein Mangel an spezifischen T-Zellen im peripheren Blut zu einer geringeren Aktivierung der B-Zellen führt.

2.2 T_H1- und T_H2-assoziierte Antikörpersubtypen

T-Helferzellen sind indirekt an der Bildung von Antikörpern beteiligt, indem sie zur vollständigen Aktivierung der B-Zellen beitragen und die Differenzierung der Immunglobuline in verschiedene Subtypen fördern (Snapper und Paul, 1987; Mond *et al.*, 1995). Die T_H1- bzw. T_H2-assoziierten Zytokine sowie deren Auswirkung auf die Antikörpersubtypen sind abhängig von der Tierspezies (Brown *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998).

Die Wirkung verschiedener T_H1- oder T_H2-assoziiierter Zytokine auf bovine B-Zellen wurde *in vitro* untersucht. Dabei begünstigten die typischen T_H1-assoziierten Zytokine IFN- γ und IL-2 vor allem die Synthese von Immunglobulin (Ig) M und IgG₂ (Estes *et al.*, 1994; 1995). Somit wäre es denkbar, dass in der frühen T_H1-dominierten Phase einer MAP-Infektion beim Rind sowohl MAP-spezifisches IgM als auch IgG₂ gebildet werden (Koets *et al.*, 2001). Die T_H2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-13 fördern dagegen *in vitro* einen Antikörper-Switch von IgM zu IgG₁ und IgE (Trigona *et al.*, 1999; Estes und Brown, 2002). Ein wichtiger Stimulus für den Klassenwechsel beim Rind von IgM zu IgA stellt das Zytokin TGF- β dar. IL-2 und IL-10 besitzen beim Rind eine synergistische Wirkung auf die Synthese von IgA (Estes, 1996; Estes und Brown, 2002). Eine Quelle für TGF- β und IL-10 stellen unter anderem die regulatorischen T-Zellen dar (Levings *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2008). Demnach müsste die spätere T_H2-dominierte Phase einer MAP-Infektion mit einer vermehrten Bildung von MAP-spezifischem IgG₁ und IgA einhergehen.

Es gibt nur wenige Studien, welche den Gehalt der Antikörpersubtypen im Blut von MAP-infizierten Rindern über längere Zeit beobachtet haben. Ziel einer Studie von

Koets *et al.* (2001) war es, den Wechsel von der T_H1 -Antwort zur T_H2 -Antwort beim Übergang vom klinisch inapparenten zum klinischen Stadium anhand von MAP-spezifischen Antikörpersubtypen nachzuweisen. MAP-spezifisches IgM, IgA, IgG₁ und IgG₂ wurden mittels ELISA gemessen, welcher mit 4 verschiedenen Antigenen beschichtet worden war [Hitzeschockproteine (Hsp 70, Hsp 65), Lipoarabinomannan (LAM) und purified protein derivative (PPD) von MAP]. Getestet wurden Serumproben von Rindern eines MAP-unverdächtigen Betriebes (n = 50) und Serumproben von Rindern eines MAP-positiven Betriebes (n = 126). Die Serumproben des MAP-positiven Betriebes wurden weiter unterteilt in Serumproben von Paratuberkulosekranken (n = 15) und von geimpften Rindern (n = 25), sowie von asymptomatischen Ausscheidern (n = 39) und von Nicht-Ausscheidern (n = 47). Nur das PPD-MAP-spezifische IgG₁ war bei den an Paratuberkulose erkrankten Rindern im Vergleich zu den asymptomatischen Ausscheidern erhöht. Das MAP-spezifische IgG₂ lag bei allen untersuchten Antigenen im Vergleich zu IgG₁ in niedrigeren Konzentrationen vor. An Paratuberkulose erkrankte Tiere und asymptomatische Ausscheider wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren aber einen signifikant höheren PPD-spezifischen IgG₂-Titer auf. Bei Betrachtung des Gesamt-IgG₁ und -IgG₂ zeigten sich im Blut an Paratuberkulose erkrankter Tiere in beiden Fällen niedrigere Titer als bei den asymptomatischen Ausscheidern. MAP-spezifisches IgA wurde mit allen verwendeten Antigenen nur sporadisch bei klinisch erkrankten Tieren und bei Ausscheidern detektiert, die IgM-Antwort war in den beiden Rindergruppen ebenfalls nicht signifikant verschieden.

Abbas *et al.* (1988) zeigten, dass nur 45 % der adulten Rinder (n = 20), die MAP mit dem Kot ausschieden, einen (niedrigen) MAP-spezifischen IgA-Titer im PPA-ELISA aufwiesen. Untersuchungen bezüglich des darmassoziierten MAP-spezifischen IgA beim Rind sind in der Literatur nicht vorhanden. Nur Begara-McGorum *et al.* (1998) untersuchten in der frühen Phase der Infektion (bis 8 Wochen *post infectionem*) MAP-spezifisches IgA im Schleim der Darmschleimhaut von experimentell mit MAP-infizierten Schaflämmern. Weder bei den MAP-infizierten Lämmern (n = 8) noch bei den Kontrolllämmern (n = 8) stiegen das erregerspezifische Serum-IgA und das Darm-IgA an. Vergleichende Untersuchungen zur Dynamik der verschiedenen Antikörpersubtypen im Verlauf einer experimentellen MAP-Infektion beim Kalb sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

2.3 Antigene von MAP und deren Verwendung zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper

Die Serodiagnostik MAP-infizierter Tiere scheiterte bisher an der Möglichkeit ein spezifisches Antigen zu identifizieren, welches MAP von anderen Mykobakterien unterscheidet und gleichzeitig in allen Infektionsstadien eine immunogene Wirkung besitzt. Die diagnostische Verwendung von MAP-spezifischen Immunogenen böte den Vorteil, MAP-infizierte Rinder von solchen Tieren serologisch unterscheiden zu können, die infolge einer Infektion mit anderen Mykobakterien (wie z.B. MAA oder *M. bovis*) kreuz-reagierende Antikörper gegen MAP gebildet haben. Bei den in kommerziell erhältlichen ELISAs bisher eingesetzten Antigenen handelt es sich jedoch hauptsächlich um kaum charakterisierte Antigengemische. In experimentellen Untersuchungen wurden dagegen auch einzelne, gut charakterisierte Antigene verwendet. Neben den im folgenden Abschnitt aufgeführten Antigengemischen lassen sich unter den gut charakterisierten Antigenen die lipidhaltigen Antigene und die Proteinantigene unterscheiden.

2.3.1 Antigengemische

Kulturfiltrate

Johnin-PPD ist ein Antigengemisch, welches aus dem Überstand von MAP-Kulturen gewonnen wird. Die Herstellung von PPD ist unter anderem auch deshalb nicht einheitlich, weil verschiedene MAP-Stämme zur Produktion verwendet werden (Semret *et al.*, 2006). Zur Herstellung von PPD wird der Überstand einer Bakterienkultur gefiltert und mit 40 %iger Trichloressigsäure behandelt. Das Präzipitat wird abgetrennt und in einem Natriumphosphat-Puffer gelöst. PPD wird überwiegend als Testantigen zur *in vitro*-Stimulation von Blutzellen und zum intradermalen Johnin-Test verwendet, wobei mit beiden Verfahren das Vorhandensein einer MAP-spezifischen zellulären Immunantwort geprüft wird (Stabel und Whitlock, 2001; Robbe-Austerman *et al.*, 2007). Nur Koets *et al.* (2001) verwendeten MAP-PPD als Antigen im ELISA um MAP-spezifische Antikörper differenziert nach Klassen und Subtypen bei Rindern zu messen.

Antikörper in den Seren MAP-infizierter Kühe scheinen stärker mit sezernierten als mit zellständigen MAP-Proteinen zu reagieren (Cho und Collins, 2006; Cho *et al.*, 2006). Auf dieser Beobachtung basierend wurden die sezernierten Proteine aus MAP-Kulturen in der frühen bis mittleren Log-Phase geerntet und als stationäres Testantigen im ELISA eingesetzt. Zur Evaluierung des Tests wurden 444 Serumproben von

kulturell-bakteriologisch MAP-positiven (Kot) Rindern und 412 Serumproben von Rindern aus Paratuberkulose-freien Herden getestet (Shin *et al.*, 2008). Nach den Ergebnissen der Receiver Operating Characteristics (ROC)-Analyse erzielte dieser ELISA im Vergleich zu 4 kommerziell erhältlichen ELISAs (HerdChek[®], PARACHEK[®], SERELISA[®], Pourquier[®]) die beste Kombination aus Sensitivität (56 %) und Spezifität (99 %). Der in Deutschland erhältliche Pourquier[®]-ELISA war in dieser Studie bei einer 100 %igen Spezifität zu 28 % sensitiv.

Protoplasmatisches Antigen

Das protoplasmatische Antigen (PPA) ist ein Antigengemisch, das aus dem Überstand von Bakterien gewonnen wird, deren Zellwand zuvor durch physikalische Einwirkung zerstört und abgetrennt wurde. Die Herstellung von PPA wurde erstmalig 1969 beschrieben und umfasste folgende Schritte: Zerstörung der bakteriellen Zellwand durch Druck, Ultrazentrifugation, Filtration und Entfernung der Lipide aus dem Überstand (Stottmeier *et al.*, 1969). Später wurde die Herstellung von PPA dadurch vereinfacht, dass die bakterielle Zellwand mittels Ultraschall zerstört und anschließend die großen unlöslichen Partikel mittels Zentrifugation aus dem Lysat entfernt wurden (Waters *et al.*, 2003; Cho und Collins, 2006). PPA ist auch unter den Begriffen Ganzzelllysat (engl.: whole cell sonicate) oder Zellextrakt bekannt.

Zellwandantigene

Speer *et al.* (2006) versuchten, intakte Zelloberflächenantigene aus MAP-Bakterien zu gewinnen, um diese als Antigene im ELISA einzusetzen. Dazu wurden die per Zentrifugation aus der Kultur isolierten Bakterien in einer 37 %igen Formaldehyd-Lösung aufgenommen und anschließend kurz mit Ultraschall (2 sec) behandelt. Das Lysat wurde zentrifugiert und der Überstand als Testantigen im ELISA eingesetzt. Dieser ELISA erreichte bei der Untersuchung von 23 kulturell-bakteriologisch MAP-negativen (Kot) Rindern und 35 MAP-Ausscheidern bei einer 100 %igen Spezifität eine Sensitivität von 96 %. In einer sich anschließenden Studie wurden verschiedene organische Lösungsmittel wie Aceton, Chloroform, Ethanol oder Isopropanol zur Extraktion von Oberflächenantigenen verwendet (Eda *et al.*, 2006). Die verschiedenen Extrakte wurden dann einzeln im ELISA als Testantigene geprüft, wobei die besten Ergebnisse mit Ethanol-Extrakten erzielt wurden. Ein mit diesem Antigenextrakt beschichteter ELISA war bei der Untersuchung von 38 kulturell-bakteriologisch MAP-negativen (Kot) Rindern und 51 MAP-Ausscheidern zu 100 % spezifisch und zu 97,4 % sensitiv. Bei Rindern, die nur eine geringe Menge MAP (< 5 KbE/g Kot; n = 29) mit dem Kot ausschieden, wurde eine Sensitivität von 96,6 % erreicht, wohingegen ein mit PPA-

beschichteter kommerzieller ELISA (Biocor Animal Health) nur 13,0 % dieser Tiere als positiv erkannte.

2.3.2 Lipidhaltige Antigene

Ein wichtiges Merkmal der Mykobakterien ist die lipidreiche Zellwand, worauf die hohe Säure- und Alkoholfestigkeit dieser Gattung zurückzuführen ist. Die mykobakterielle Zellwand ist aus 3 unterschiedlichen Schichten aufgebaut (McNeil und Brennan, 1991; Brennan und Nikaido, 1995). Diese besteht aus einer inneren Peptidoglykanschicht, welche mit Arabinogalactanen gekoppelt ist, einer mittleren Schicht von Mykolsäuren und einer äußeren vorwiegend aus Peptidoglycolipiden bestehenden Schicht.

Lipoarabinomannan

Ein immunogenes Zellwandantigen der Mykobakterien ist das Lipoarabinomannan (LAM). LAM ist ein Glycolipid, welches alle Schichten der bakteriellen Zellwand durchdringt und die Zellmembran mit der Zellwand verankert. LAM besitzt verschiedene immunmodulatorische Wirkungen: Stimulierung der B-Zellen und der regulatorischen T-Zellen sowie Verminderung der IFN- γ -vermittelten Aktivierung von Makrophagen (Ellner und Daniel, 1979; Moreno *et al.*, 1988; Sibley *et al.*, 1988; Chan *et al.*, 1991). LAM ist immunogen und löst eine starke humorale Immunantwort in MAP-infizierten Rindern aus. LAM wurde aus diesem Grund in mehreren Studien als Testantigen im ELISA eingesetzt (Sugden *et al.*, 1987; Jark *et al.*, 1997). Allerdings sind auf LAM-basierende ELISAs zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper wegen der ähnlichen Struktur der LAMs anderer Mykobakterien (z.B. *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. smegmatis* und *M. fortuitum*) wenig spezifisch (McNab *et al.*, 1991; Khoo *et al.*, 2001). Die Herstellung von LAM wurde schon 1986 beschrieben (Sugden *et al.*, 1987). Jark *et al.* (1997) entwickelte die Herstellung von LAM weiter und etablierte einen auf LAM-basierenden ELISA zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper beim Rind. Zur Evaluierung des ELISAs wurden 18 MAP-positive und 98 MAP-negative Rinder untersucht, wobei als Goldstandard der kulturelle Erregernachweis im Ileocaecallymphknoten diente. Dieser ELISA erreichte eine Sensitivität von 79 % und eine Spezifität von 99 %. Auch bei experimentell mit MAP infizierten Kälbern (n = 3) konnten mit einem auf LAM-basierenden ELISA ab dem 134. Tag nach der Inokulation MAP-spezifische Antikörper in Serumproben nachgewiesen werden (Waters *et al.*, 2003). In mehreren Ländern werden ELISA-Testkits vertrieben, in denen LAM als Testantigen dient (Nielsen und Toft, 2008). In Deutschland war der auf LAM basierende Svanovir®-ELISA bis 2008 im Handel erhältlich. Im Vergleich zu den derzeit

erhältlichen ELISAs (Pourquier[®]-, ID Screen[®]-, Cattletype[®]-, PARACHEK[®]2-ELISA) war der Svanovir[®]-ELISA bei dem vom Hersteller angegeben Cut Off-Werten jedoch weniger spezifisch (**Tabelle 3**).

Glycopeptidolipide

Glycopeptidolipide (GPL) sind eine Gruppe von immunogenen Antigenen, welche in der Zellwand lokalisiert sind und bei einigen nicht-tuberkulösen Mykobakterien sowie bei saprophytären Mykobakterien vorkommen (Brennan und Nikaido, 1995; Billman-Jacobe, 2004). Mehr als 70 % der Lipide der Bakterienzelloberfläche können den GPLs zugeordnet werden (Billman-Jacobe, 2004). GPL sind beteiligt an der Interaktion der Mykobakterien mit Makrophagen und beeinflussen die Bildung von bakteriellen Biofilmen (Lee *et al.*, 1991; Riviere *et al.*, 1996; Villeneuve *et al.*, 2003; Biet *et al.*, 2008). GPL-Moleküle besitzen einen Kern aus 4 Aminosäuren. Dieses Tetrapeptid ist kovalent an eine einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäure gebunden, welche aus 32 bis 36 C-Atomen besteht. Mit diesem Lipopeptidkern sind jeweils verschiedene Mono- oder Oligosaccharide verbunden, deren strukturelle Heterogenität die morphologische Grundlage für die Serotypisierung von *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* und *M. avium* subsp. *avium* ist (Brennan und Nikaido, 1995; Chatterjee und Khoo, 2001). Camphausen *et al.* (1985) wollten auch in MAP Serovar-spezifische GPL nachgewiesen haben, mussten jedoch feststellen, dass dieses Ergebnis auf eine Kontamination des untersuchten MAP-Stammes mit MAA Serovar 2 zurückzuführen war (Chiodini, 1993). Anstelle der Serovar-spezifischen GPL besitzt MAP Lipopeptide, deren Kernregionen aus 5 Aminosäuren bestehen. Eine Besonderheit dieser Lipopentapeptide (L5P) ist die kürzere gesättigte Fettsäurekette mit 16-20 C-Atomen (Biet *et al.*, 2008). Ein mit L5P beschichteter ELISA war im Vergleich zu MAP-PPD spezifischer und es scheint, dass vor allem der Peptidanteil von L5P in der Lage ist, eine MAP-spezifische humorale Immunantwort in natürlich mit MAP-infizierten Rindern auszulösen. Allerdings wurden diese Ergebnisse an Serumproben von nur einem natürlich mit *M. bovis* infizierten Rind, von zwei experimentell mit MAA infizierten Mäusen sowie von 4 natürlich mit MAA infizierten Menschen generiert.

2.3.3 Proteinantigene

Die meisten MAP-Antigene, welche bisher auf ihre Immunogenität beim Rind untersucht wurden, lassen sich den Proteinantigenen zuordnen. Die Proteine sind nachfolgend nach Funktion, Lokalisation in der Bakterienzelle sowie der Art und Weise unterteilt, mit denen sie präpariert wurden. In **Tabelle 1** sind wichtige immunogene

Proteine von MAP zusammengefasst, welche nachweislich von MAP *in vitro* exprimiert werden.

Tabelle 1: Immunogene Proteine von MAP (Auswahl)

In der Übersicht sind nur diejenigen immunogenen Proteine aufgelistet, welche von MAP *in vitro* exprimiert werden. Die Reihung erfolgte aufsteigend nach der Molekularen Masse.

Bezeichnung	Molekulare Masse	Lokalisation	Funktion	Referenz
GroES (Hsp 10)	10 kDa	Zell-assoziert	Chaperon	Cobb und Frothingham, 1999
14 kDa Protein	14 kDa	Kultur-überstand	k.A.	Olsen <i>et al.</i> , 2000
HspX	~17 kDa	Zell-assoziert	evtl. intrazelluläres Überleben	Bannantine und Stabel, 2000
AhpD	19 kDa	intrazellulär	antioxidative Wirkung	Olsen <i>et al.</i> , 2000
Lipoprotein	19 kDa	Kultur-überstand	k.A.	Huntley <i>et al.</i> , 2005
Lipoprotein	22 kDa	Zell-assoziert	k.A.	Dupont <i>et al.</i> , 2005
SOD	23 kDa	intra- und extrazellulär	Schutz vor oxidativem Stress	Liu <i>et al.</i> , 2001; Mullerad <i>et al.</i> , 2002
Ag85A	30 kDa	v.a. Kultur-überstand	Fibronectin-Rezeptor	Wiker und Harboe, 1992
Ag85B (Antigen A)	31 kDa	v.a. Kultur-überstand	Fibronectin-Rezeptor	Wiker und Harboe, 1992
Ag85C	32 kDa	v.a. Kultur-überstand	Fibronectin-Rezeptor	Wiker und Harboe, 1992
P34, Teil des A36-Komplex	34 kDa	Zellwand	B-Zell-Epitop	Gilot <i>et al.</i> , 1993
Serinprotease	34 kDa	intrazellulär	Serinprotease	Cameron <i>et al.</i> , 1994
P35	35 kDa	Membranprotein	Invasion von Epithelzellen	El-Zaatari <i>et al.</i> , 1997
AhpC	45 kDa	intrazellulär	antioxidative Wirkung	Olsen <i>et al.</i> , 2000

Fortsetzung und Erläuterung der **Tabelle 1** auf der nächsten Seite

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Bezeichnung	Größe	Lokalisation	Funktion	Referenz
GroEL (Hsp 65K)	65 kDa	Zell-assoziiert	Chaperon	El-Zaatari, Naser <i>et al.</i> 1995
Erläuterungen:				
	Ahp:	Alkylhydroperoxid-Reduktase		
	Hsp:	Hitzeschockprotein		
	k.A.:	keine Angaben		
	SOD:	Superoxiddismutase		

2.3.3.1 Nachweislich *in vitro* exprimierte Proteine mit bekannter Funktion oder Lokalisation

Hitzeschockproteine

Die Proteine GroEL und GroES (GroEL/GroES-Komplex) gehören zur Familie der Hitzeschockproteine und werden in einer Vielzahl von Bakterien sowie auch in Eukaryonten vorgefunden. Die Proteine des GroEL/GroES-Komplex agieren als Chaperone und unterstützen die Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur von neu synthetisierten Bakterienproteinen (El-Zaatari *et al.*, 1995).

Das mykobakterielle GroEL-Protein wird auch als Hitzeschockprotein (Hsp) 65K bezeichnet und stellt ein immunogenes Antigen bei mykobakteriellen Infektionen dar (Shinnick, 1987; Thole *et al.*, 1988). Das GroEL-Protein von MAP ist in seiner Aminosäuresequenz den GroEL-Proteinen von MAA (98 %), *M. tuberculosis* (93 %) und *M. leprae* (89 %) homolog (Harris und Barletta, 2001). Die Analyse von Serumproben aus Paratuberkulose-kranken und klinisch inapparent mit MAP infizierten Rindern ergab bei Verwendung von MAP-GroEL als Testantigen im Immunoblot eine niedrige Sensitivität, da nur 3 von 10 Kranken und 5 von 25 inapparent infizierten Rindern seropositiv reagierten (El-Zaatari *et al.*, 1995).

GroES wird auch als Hsp 10, 10 kDa-Hitzeschockprotein, 10 kDa-Antigen oder Chaperon 10 bezeichnet (Cobb und Frothingham, 1999). GroES löst bei Infektionen des Menschen mit *M. tuberculosis* und *M. leprae* eine zelluläre und humorale Immunantwort aus (Barnes *et al.*, 1992; Rojas und Segal-Eiras, 1996). Die GroES-Gensequenzen von MAP und MAA sind identisch und zu den entsprechenden Sequenzen von *M. leprae* und *M. tuberculosis* zu 90 % homolog (Cobb und Frothingham, 1999).

Über Untersuchungen zur Immunogenität von GroES beim Rind wurde in der Fachliteratur bisher nicht berichtet.

Enzyme

Die Alkylhydroperoxid-Reduktase Proteine AhpC (45 kDa) und AhpD (19 kDa) bieten Schutz vor oxidativen Metaboliten und werden von MAP in größeren Mengen exprimiert als von MAA (Olsen *et al.*, 2000). Oxidativer Stress kann aber auch bei MAA eine erhöhte Expression von AhpC und AhpD auslösen (Sherman *et al.*, 1995). Die identische N-terminale Aminosäuresequenz von AhpC wurde in MAA und *M. tuberculosis* nachgewiesen. Des Weiteren wurde ein Peptid in *M. tuberculosis* identifiziert, dessen Aminosäuresequenz zur der von AhpD 80 % homolog war. AhpC und AhpD wirken bei einer MAP-Infektion immunogen und provozieren eine zelluläre und eine humorale Immunantwort. Bei der Verwendung von AhpC als Testantigen reagierten aber nur 27 % der MAP-Ausscheider (48 Rinder) seropositiv und bei der Verwendung von AhpD sogar nur 15 %. Die in derselben Studie mit *M. bovis*-infizierten Tiere (n = 12) reagierten alle serologisch negativ (Olsen *et al.*, 2001).

Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid um und bietet somit Schutz vor oxidativem Stress. Die bakterielle SOD ist in der Regel ein intrazelluläres Enzym, bei *M. tuberculosis* und *M. bovis* wird sie jedoch auch in größeren Mengen im Kulturüberstand vorgefunden (Raynaud *et al.*, 1998). Apathogene Mykobakterien setzen SOD nicht in die Umgebung frei, so dass die extrazelluläre SOD der pathogenen Mykobakterien möglicherweise zu deren Virulenz beiträgt (Harth und Horwitz, 1999). Auch MAP setzt eine SOD frei, die nach Verimpfung in aufgereinigter Form an Mäusen in der Lage ist, bei diesen eine humorale und zelluläre Immunantwort auszulösen (Liu *et al.*, 2001; Mullerad *et al.*, 2002). Serumproben von insgesamt 88 Rindern wurden im SOD-beschichteten ELISA auf MAP-spezifische Antikörper untersucht (Shin *et al.*, 2004). Bei Verwendung desjenigen Cut Off-Wertes, bei welchem die maximale Sensitivität und Spezifität erreicht wurden, erzielte der ELISA in der ROC-Analyse eine Sensitivität von 90,9 % und eine Spezifität von 80,8 %.

Zellwandproteine

In der Zellwand vieler Mykobakterienspezies ist ein Molekülkomplex aus thermostabilen, makromolekularen Antigenen (TMA) vorhanden (De Kesel *et al.*, 1992). Der am besten erforschte TMA-Komplex ist der A60-Komplex von *M. bovis* (Fabre *et al.*, 1986; Cocito *et al.*, 1987). Der TMA-Komplex von MAP wird als A36-Komplex bezeichnet (Gunnarsson und Fodstad, 1979). Der A36-Komplex besteht aus Poly-

sacchariden, Proteinen und Lipiden, die bei der MAP-Infektion sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervorrufen können (Fabre *et al.*, 1986; De Kesel *et al.*, 1992; Gilot *et al.*, 1992). Die Verwendung des gesamten A36-Komplexes als Testantigen in der serologischen Diagnostik scheint jedoch aufgrund der Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien (MAA, *M. bovis*, *M. phlei*) nicht sinnvoll (De Kesel *et al.*, 1993).

Das 34 kDa-Protein (P34) gehört zu dem A36-Komplex von MAP (De Kesel *et al.*, 1992; De Kesel *et al.*, 1993; Vannuffel *et al.*, 1994). P34 ist immundominant und enthält B-Zell-spezifische Epitope (Gilot *et al.*, 1993; Ostrowski *et al.*, 2003). P34 besitzt zwei unterschiedliche Regionen: ein hydrophobes Aminoende, welches in der bakteriellen Zellwand liegt und ein hydrophiles Carboxylende, das an der Bakterienzelloberfläche lokalisiert ist (Gilot *et al.*, 1993). Das Carboxylende galt lange Zeit als MAP-spezifisch (De Kesel *et al.*, 1993; Coetsier *et al.*, 1998). Mittlerweile wurde es aber auch in MAA und *M. intracellulare* nachgewiesen (Ostrowski *et al.*, 2003; Malamo *et al.*, 2007). De Kesel *et al.* (1993) stellten ein rekombinantes Polypeptid (a362) her, welches dem Carboxylende von P34 entsprach. Bei der serologischen Untersuchung von 30 MAP-ausscheidenden Rindern und 175 Rindern in zwei Paratuberkulose-freien Herden, erreichte ein mit dem Antigen a362 beschichteter ELISA eine Sensitivität von 70 % und eine Spezifität von 95 % (Vannuffel *et al.*, 1994). Malamo *et al.* (2006) etablierten einen ELISA, der mit dem Carboxylende des 34 kDa-Proteins aus MAP beschichtet wurde. Die zu untersuchenden Seren wurden zuvor mit dem Carboxylende des 34 kDa-Proteins aus MAA adsorbiert und anschließend direkt (ohne Zentrifugationsschritt) im ELISA eingesetzt. Dieser ELISA erkannte alle 18 untersuchten MAP-Ausscheider als positiv, wohingegen ein kommerziell erhältlicher ELISA nur 11 (61,1 %) dieser Rinder als positiv identifizierte. Die 50 getesteten MAP-negativen Rinder reagierten in beiden ELISAs seronegativ.

Membranproteine

Ein 35 kDa schweres Protein von *M. leprae* ruft bei an Lepra erkrankten Menschen eine spezifische zelluläre Immunantwort hervor (Triccas *et al.*, 1996). Dieses immunogene 35 kDa-Protein wurde im Immunoblot mit *M. leprae*-spezifischen monoklonalen Antikörpern identifiziert. Sein Gen wurde anschließend kartiert und sequenziert (Ivanyi *et al.*, 1983; Winter *et al.*, 1995). Banasure *et al.* (2001) identifizierten im Chromosom von MAP ein zu diesem Gen zu 82,8 % homologes Gen, welches ebenfalls ein 35 kDa-Protein (P35) kodiert. Das P35 von MAP ist in seiner Aminosäuresequenz dem 35 kDa-Protein von *M. leprae* zu 90,3 % und dem 35 kDa-Protein von MAA zu 95,1 % homolog. Bei MAP ist das P35 ein Membranprotein,

welches teilweise auf der Zelloberfläche exponiert ist und vermutlich bei der Invasion des Erregers in Epithelzellen eine Rolle spielt (Bannantine *et al.*, 2003). Bei der Verwendung von rekombinant hergestelltem P35 als Testantigen im Immunoblot reagierten alle 12 Serumproben von an Paratuberkulose erkrankten Rindern und 15 von 20 Serumproben von Rindern im klinisch inapparenten Stadium positiv (El-Zaatari *et al.*, 1997). Serumproben von *M. bovis*-infizierten Rindern reagierten nicht. Bei der Untersuchung von 25 Referenzseren [15 kulturell-bakteriologisch MAP-positive (Kot) Rinder im klinisch inapparenten Stadium und 10 kulturell-bakteriologisch MAP-negative Rinder] war der P35-Immunoblot sensitiver (73 %) als zwei in den USA kommerziell erhältliche ELISAs [Allied-ELISA (Sensitivität 53 %), John's Absorbed ELISA (Sensitivität 40 %)] (El-Zaatari *et al.*, 1997). Für den Vergleich der Antigene P35, Ag85 und SOD hinsichtlich ihrer Eignung zum Testantigen im ELISA wurden Serumproben von 60 MAP-ausscheidenden und 22 MAP-negativen Rindern untersucht (Shin *et al.*, 2004). Dabei erzielte man mit P35 die höchste Sensitivität (93,3 %) und Spezifität (86,4 %). Die Befunde für 400 Rinderserumproben in dem kommerziell erhältlichen John's Absorbed ELISA unterschieden sich von den Befunden im P35-ELISA nur in zwei Fällen. Im Vergleich zu Ag85A und Ag85B induziert P35 jedoch eine schwächere zelluläre Immunantwort. So waren im Blut von MAP-Ausscheidern (Alter 2 bis 3 Jahre) weniger zur IFN- γ -Bildung anzuregende Leukozyten nachzuweisen, wenn man P35 als Testantigen verwendete, als wenn man dazu Ag85A und Ag85B einsetzte (Shin *et al.*, 2005). Auch bei 40 von 53 (75,5 %) untersuchten Morbus-Crohn-Patienten wurden Antikörper gegen MAP-P35 nachgewiesen (Naser *et al.*, (2000).

Sezernierte Proteine

Die Hauptfraktion der sezernierten Proteine bei *M. tuberculosis* und *M. bovis* wird von dem sog. Ag85-Komplex gebildet, welcher aus je einem Molekül der 3 Proteine Ag85A, Ag85B und Ag85C zusammengesetzt ist (Wiker und Harboe, 1992). Die molekulare Masse dieser 3 Proteine liegt zwischen 30 und 32 kDa. Der Ag85-Komplex enthält Fibronectin-Bindungsstellen (Peake *et al.*, 1993). Wie das Hitzeschockprotein GroES trägt wahrscheinlich auch Ag85B zur hohen Hitzeresistenz von MAP bei (Sung *et al.*, 2004). Alle Mykobakterien besitzen Antigene der Ag85-Familie. Aufgrund der ähnlichen Ag85-Molekülstruktur gibt es Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Mykobakterienspezies (Wiker und Harboe, 1992; Leid *et al.*, 2002). Die Aminosäuresequenzen von Ag85A, Ag85B und Ag85C von MAP sind zu denjenigen der 3 Antigene von MAA zu jeweils 99 % identisch (Yarnall und Corbeil, 1989). Zum Vergleich der Immunreaktionen von Rindern gegen Ag85A, Ag85B und Ag85C wurden Serumproben von MAP-Ausscheidern (n = 60) und MAP-Negativen (n = 22), im Ag85A-, Ag85B- oder

Ag85C-beschichteten ELISA untersucht (Shin *et al.*, 2004). Der Ag85B-ELISA war dabei am sensitivsten (71,7 %) und spezifischsten (86,4 %). Ag85A und Ag85B induzierten auch eine kräftige T-Zell-vermittelte Immunreaktion (Mullerad *et al.*, 2002; Rosseels *et al.*, 2006).

Das sezernierte 14 kDa-Protein ist für die Bakterienspezies im *M. avium*-Komplex spezifisch und kommt demzufolge nicht bei *M. tuberculosis* oder *M. bovis* vor (Olsen *et al.*, 2000). Antikörper gegen das 14 kDa-Protein konnten aber nur bei 13 von 48 (27 %) kulturell-bakteriologisch MAP-positiven (Kot) Rindern nachgewiesen werden (Olsen *et al.*, 2001). Die Autoren schlussfolgerten deshalb, dass dieses Protein zur Verwendung als einzelnes Antigen in einem serologischen Testsystem nicht geeignet ist.

Ausgehend von den Erkenntnissen über ein von *M. tuberculosis* sezerniertes 19 kDa-Lipoprotein, wurde eine Gensequenz bei MAP identifiziert, welche ein homologes 19 kDa-Protein kodiert (Huntley *et al.*, 2005). Die Aminosäuresequenz des 19 kDa-Lipoproteins von MAP weist zu den Aminosäuresequenzen der 19 kDa-Lipoproteine von MAA eine 95 %ige, von *M. intracellulare* eine 84 %ige und von *M. bovis* und *M. tuberculosis* eine 76 %ige Homologie auf (Fonseca *et al.*, 2000; Hohn *et al.*, 2001). Wurde das 19 kDa-Lipoprotein als Testantigen in einem Immunoblot eingesetzt, um Rinderseren auf MAP-spezifisches IgG zu untersuchen, reagierten 64 % der Paratuberkulose-kranken Rinder seropositiv (n = 14) und 89 % der kulturell-bakteriologisch (Kot) MAP-negativen Rinder seronegativ (n = 9) (Olsen *et al.*, 2001).

2.3.3.2 Rekombinant hergestellte Proteine ohne nachweisliche Expression *in vitro*

Die 3 MAP-spezifischen Sequenzen IS900, F57 und ISMav2 werden häufig in der molekularbiologischen Diagnostik zur Identifizierung von MAP verwendet (Green *et al.*, 1989; Poupart *et al.*, 1993; Strommenger *et al.*, 2001). IS900 codiert unter anderem für ein 43 kDa-Protein (P43), welches vermutlich die Funktion einer Transposase besitzt (Tizard *et al.*, 1992; Doran *et al.*, 1994). Bei mit MAP-infizierten Kaninchen konnten mit einem auf rekombinanten P43-Testantigen basierten Test allerdings keine Antikörper gegen P43 nachgewiesen werden (El-Zaatari *et al.*, 1994). Berichte zur Immunogenität von P43 beim Rind sind nicht vorhanden.

Eine weitere MAP-spezifische 30 bp-Nukleotidsequenz wurde mittels DNA-Hybridisierung im Gen *hspX* nachgewiesen (Ellingson *et al.*, 1998). Ein mit rekombinanten HspX (rHspX) beschichteter ELISA erkannte jedoch nur 4 von 24 MAP-positiven Rindern (16,6 %) als seropositiv (Bannantine und Stabel, 2000).

Durch den partiellen Vergleich der Genome von MAP und MAA wurden 21 MAP-spezifische Gene identifiziert, die für Proteine mit Molekularmassen von 7 bis 91 kDa kodierten (Bannantine *et al.*, 2002). Im Immunoblot, in denen diese Proteine in rekombinanter Form eingesetzt wurden, reagierten jedoch nur 5 der 21 Proteine mit Serumproben von Kaninchen, welche zuvor mit MAP immunisiert worden waren. Eines der 5 Proteine (Antigen 241) reagierte im Immunoblot mit den Serumproben von allen 6 kulturell-bakteriologisch MAP-positiven (Kot) Rindern, Antikörper gegen die anderen Proteine wurden bei mindestens 4 der 6 Rinder nachgewiesen (Bannantine *et al.*, 2004). Eine andere Arbeitsgruppe entdeckte 13 weitere MAP-spezifische Gene, von denen 9 Proteine rekombinant hergestellt werden konnten (Paustian *et al.*, 2004). Nur 3 dieser Proteine (MAP0862, MAP3732c, MAP2963) reagierten im Immunoblot mit Serumproben von natürlich mit MAP infizierten Rindern. Das beste Resultat wurde mit dem Protein MAP0862 erreicht.

Die komplette Sequenzierung des Genoms des MAP K10-Stammes ermöglichte die Identifizierung von weiteren MAP-spezifischen Gensequenzen (Li *et al.*, 2005). Mit dieser Information stellte die US-amerikanische Arbeitsgruppe um Bannantine insgesamt 92 MAP-Proteine rekombinant her und untersuchte diese auf ihre Antigenität mittels Dot-Blot-Array (Bannantine *et al.*, 2008; Bannantine *et al.*, 2008). Dazu wurden Serumproben von 2 intratonsillär mit MAP infizierten Kälbern und von 9 MAP-infizierten adulten Rindern im klinisch inapparenten Stadium untersucht. Die beiden experimentell infizierten Kälber reagierten ab dem 70. Tag *post infectionem* (T.p.i.) stark mit den beiden Proteinen MAP1087 und MAP1204. Jedoch wiesen nur 5 Adulte (55,5 %) Antikörper gegen diese Proteine auf. Auch gegen MAP0862 zeigten die beiden Kälber am 70. T.p.i. eine positive Reaktion, die in den folgenden Wochen aber wieder schwächer wurde. Die Kälber bildeten auch Antikörper gegen die rekombinanten Proteine MAP3155c, MAP0860c und MAP3817c, allerdings waren die Testsignale schwach und nicht immer bei beiden Kälbern vorhanden.

Leroy *et al.* (2009) entdeckten in ähnlichen Untersuchungen 87 MAP-spezifische Sequenzen. Davon wurden 3 Proteine rekombinant hergestellt und als Testantigene im ELISA eingesetzt. Insgesamt wurden Serumproben von 18 MAP-ausscheidenden und von 48 kulturell-bakteriologisch MAP-negativen (Kot) Rindern getestet. Der ELISA, in dem MAP1637c als Testantigen eingesetzt wurde, war in dem getesteten Protokoll zu 82 % sensitiv und zu 98 % spezifisch. Im Vergleich dazu schnitt der Pourquier[®]-ELISA bei der Untersuchung derselben Serumproben schlechter ab (Sensitivität 72 % und Spezifität 92 %).

3 Serologische Nachweisverfahren für MAP-Infektionen beim Rind

Für den Nachweis MAP-spezifischer Antikörper bei Rindern wurden bisher 4 Testverfahren verwendet, nämlich die Komplementbindungsreaktion (KBR), der Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT), der Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) und ein auf der Durchflussszytometrie basierendes Verfahren (DFZM-Methode). Von den kommerziell erhältlichen Testsystemen (KBR, AGIDT, ELISA) ist der ELISA das Nachweisverfahren mit der höchsten Sensitivität und Spezifität (Whittington und Sergeant, 2001).

3.1 Komplementbindungsreaktion

Ein Standardprotokoll für die KBR zur Diagnose von MAP-Infektionen beim Rind ist im „OIE (Office International des Epizooties) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009“ (OIE, 2009) beschrieben. Das verwendete Testantigen ist nicht einheitlich, die OIE empfiehlt jedoch ein Ganzzelllysate des MAP-Stammes 316F. Laut OIE können Tiere mit der KBR im klinischen Stadium relativ zuverlässig erkannt werden. Aufgrund der mangelnden Spezifität seien positive KBR-Ergebnisse bei klinisch unauffälligen Tieren jedoch nicht aussagekräftig.

Im direkten Vergleich zu den kommerziell erhältlichen ELISAs ist die KBR auch weniger sensitiv (Colgrove *et al.*, 1989; McNab *et al.*, 1991; Sockett *et al.*, 1992). Die Sensitivität ist positiv korreliert mit der Ausscheidungsrate des Erregers im Kot und dem Alter der Tiere (de Lisle *et al.*, 1980; de Lisle *et al.*, 1980; Kalis *et al.*, 2002). Sie betrug bei „schwachen Ausscheidern“ (1-10 KbE/2 g Kot) 19 %, wohingegen bei „starken Ausscheidern“ (>100 KbE/2 g Kot) eine Sensitivität von 75 % erreicht wird (Kalis *et al.*, 2002). Andere Untersucher geben für die Sensitivität der KBR bei Rindern mit fäkaler MAP-Ausscheidung Werte von 10,8 % bis 63,9 % an (Colgrove *et al.*, 1989; Sherman *et al.*, 1990; Ridge *et al.*, 1991; Sockett *et al.*, 1992; Hilbink *et al.*, 1994; Reichel *et al.*, 1999). Die Spezifität der KBR lag zwischen 87,2 % und 99,0 %. Der Mangel an Spezifität wird auf Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien zurückgeführt. So wurden bei Rindern, die mit *Corynebacterium renale*, *Rhodococcus equi* oder Mycobactin-unabhängigen Mykobakterien infiziert waren, bei denen es aber keinen Hinweise auf eine Infektion mit MAP gab, falsch-positive Reaktionen in der KBR beobachtet (Gilmour und Goudswaard, 1972; McKenzie und Ward, 1981; Wilks *et al.*, 1981).

3.2 Agargelimmunodiffusionstest

Der AGIDT wurde als Schnelltest für Tiere mit Paratuberkulose-verdächtigen Symptomen entwickelt (Tiwari *et al.*, 2006). Eingesetzt wird der AGIDT fast ausschließlich zur Diagnose von MAP-Infektionen beim Schaf, in Australien beispielsweise für das Screening von Schafherden (Gumber *et al.*, 2006). Die Durchführung des MAP-spezifischen AGIDT ist nicht einheitlich. Im OIE-Manual (2009) ist eine Version der Methode beschrieben, welche ein Antigen aus dem Protoplasma des MAP-Stammes 18 verwendet.

Nach Sherman *et al.* (1984) ist der AGIDT nur dazu geeignet, klinisch verdächtige Rinder, Ziegen und Schafe zu testen. Die Sensitivität bei an Paratuberkulose erkrankten Tieren wird auf 90 % geschätzt (Darcel, 1995). Die Sensitivität des AGIDT korreliert mit der Menge des Erregers im Kot und dem Schweregrad der histologisch beurteilten Läsionen (Sherman *et al.*, 1989; Shulaw *et al.*, 1993; Perez *et al.*, 1997; Gumber *et al.*, 2006). In 3 voneinander unabhängigen Studien wurden Serumproben von klinisch unauffälligen aber kulturell-bakteriologisch MAP-positiven (Kot) Rindern parallel im AGIDT, in der KBR und im ELISA untersucht. Der AGIDT war mit 13,8 % bis 27,8 % am wenigstens sensitiv (Colgrove *et al.*, 1989; Sockett *et al.*, 1992; Gumber *et al.*, 2006). Die Spezifität (96,8 % bis 100 %) des AGIDT war mit der Spezifität der in den Studien verwendeten ELISAs vergleichbar.

3.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay

In Deutschland sind derzeit 4 ELISAs zugelassen (Stand Februar 2012):

- Pourquoi[®] ELISA Paratuberculosis
- ID Screen[®] Paratuberculosis Indirect
- Cattletype[®] MAP Ab
- PARACHEK[®]2 Antibody ELISA

Nicht mehr erhältlich sind die folgenden ELISAs:

- Svanovir[®] Para-TB-Ab
- HerdChek[®] Mycobacterium paratuberculosis Antibody Kit
- SERELISA[®] M. ParaTb Ab Mono Indirect

Diese ELISAs unterscheiden sich voneinander hinsichtlich des verwendeten Testantigens, der Präadsorption der Serumproben und des verwendeten Sekundärantikörpers (**Tabelle 2**). Vermutlich sind diese ELISA-Systeme deshalb auch hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität unterschiedlich. In der **Tabelle 3** sind die in verschie-

denen Untersuchungen aufgezeigten Wertepaare für Sensitivität und Spezifität der verschiedenen ELISA-Systeme zusammengestellt. Durch eine Kombination verschiedener Tests können die Sensitivität und die Spezifität der Paratuberkulose-Diagnostik erhöht werden (Böttcher und Gangl, 2004; Collins, 2006). Dabei wird nicht nur die kulturell-bakteriologische Untersuchung des Kots mit serologischen Methoden kombiniert, sondern es werden auch verschiedene ELISAs miteinander verbunden (Böttcher und Gangl, 2004). Ein Beispiel hierfür ist die sequentielle MAP-Serologie (SMAPS), die sich aus dem Einsatz eines sensitiven Screening-ELISAs und der Überprüfung positiver Proben mit zwei Tests höherer Spezifität zusammensetzt. Dazu wurden ursprünglich der Svanovir®-ELISA als Screening-Methode sowie der HerdChek®- und der Pourquier®-ELISA als Bestätigungstests eingesetzt (Böttcher und Gangl, 2004; Gangl *et al.*, 2009).

Kreuzreagierende Antikörper gegen andere Mykobakterien können die Ursache für die geringe Spezifität der ELISA-Systeme sein. Vermutlich sind es häufig Infektionen und Kontakte mit in der Umgebung der Tiere vorkommenden Mykobakterien, die ein falsch-positives Ergebnis in einem serologischen Test auf Antikörper gegen MAP erzeugen (Cousins *et al.*, 1999; Roussel *et al.*, 2007). So ist das Auftreten von falsch-positiven ELISA-Ergebnissen innerhalb einer Herde mit der Ausscheidung von normalerweise in der Umwelt vorkommenden Mykobakterien (*M. asiaticum*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. mucogenicum*, *M. non-chromogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae*-Komplex) positiv korreliert (Roussel *et al.*, 2007). Wegen der genetisch engen Verwandtschaft innerhalb der Spezies *M. avium* treten Kreuzreaktionen zwischen ihren Subspezies auf (Wilks *et al.*, 1981; Cocito *et al.*, 1994). Osterstock *et al.* (2007) untersuchten die Antikörperantwort in Kälbern (n = 19), welchen einmalig abgetötete Bakterien der Spezies MAP (n = 2), MAA (n = 3), *M. scrofulaceum* (n = 3), *M. intracellulare* (n = 3), *M. terrae* (n = 3), *M. celatum* (n = 3) oder keimfreies Medium (n = 2) subkutan injiziert wurden. Die Serumproben der Kälber wurden im Zwei-Wochen-Rhythmus über einen Zeitraum von 10 Wochen in zwei kommerziell erhältlichen ELISAs (HerdChek®, ParaChek®) untersucht. Außer denjenigen Kälbern, die mit *M. celatum* oder dem keimfreien Medium inokuliert worden waren, reagierten in diesem Zeitraum alle anderen Kälber in mindestens einem der zwei ELISAs positiv. Auch 7 von 32 (21,9 %) an boviner Tuberkulose erkrankten Rindern reagierten im HerdChek®-ELISA und dem ParaChek®-ELISA positiv (Lilenbaum *et al.*, 2009).

Mit dem Ziel falsch-positive Reaktionen zu vermeiden, wurde bereits 1984 die Adsorption der Serumproben mit einem Ganzzelllysate von *M. phlei* empfohlen, bevor sie im ELISA getestet werden (Präadsorption)(Yokomizo *et al.*, 1985). Grundlage

dieser Empfehlung war, dass mit der *M. phlei*-Präadsorption im Vergleich zur Präadsorption mit MAA, MAP oder *M. bovis* die MAP-positiven Rinder von den *M. bovis*-positiven Rinder serologisch am besten abzugrenzen waren. Ein daraufhin entwickelter ELISA erreichte bei der Untersuchung von 274 kulturell-bakteriologisch MAP-negativen (Kot) und 53 MAP-ausscheidenden Rindern eine Sensitivität von 53 % bei einer Spezifität von 98,8 % (Milner *et al.*, 1987; Milner *et al.*, 1990). Ein kommerziell erhältlicher ELISA der Firma IDEXX Laboratories konnte trotz MP-Präadsorption jedoch nicht sicher zwischen MAP- und *M. bovis*-infizierten Rindern unterscheiden (Olsen *et al.*, 2001). Olsen *et al.* (2001) versuchten die Spezifität eines ELISAs zu verbessern, indem sie die verwendeten MAP-Antigene (MAP-Kulturüberstand nach Ultraschallbehandlung) vor ihrer Verwendung als Testantigene im ELISA mit polyvalentem MAA-Antiserum adsorbierten. Von 56 kulturell-bakteriologisch positiven (Kot) Rindern konnten 37 (66 %) richtig positiv erkannt werden. Aber auch dieser ELISA konnte serologisch nicht zwischen experimentell mit MAP- und mit *M. bovis*-infizierten Rindern unterscheiden.

Neben der Verwendung unterschiedlicher Antigene und der Durchführung einer Präadsorption der Serumproben beeinflussen jedoch auch Test-unabhängige Faktoren die Wertepaare für die Sensitivität und die Spezifität der ELISA-Systeme. So hängen die Sensitivität und Spezifität eines ELISA von dem verwendeten Goldstandard ab, mit dem die Tiere der Testpopulation als MAP-positiv bzw. MAP-negativ definiert werden. Am lebenden Rind wird vorwiegend der kulturell-bakteriologische MAP-Nachweis im Kot als Goldstandard verwendet. Allerdings ist die kulturelle Untersuchung sensitiver, wenn sie an Darmgewebe vorgenommen wird als an Kot (Whittington und Sergeant, 2001). So waren von 150 kulturell-bakteriologisch negativen (Kot) Rindern aus Herden mit mäßigem Paratuberkulose-Problem (5 - 15 % MAP-Ausscheider) mehr als 30 % der Tiere bei der kulturell-bakteriologischen Organuntersuchung am Schlachthof MAP-positiv (Whitlock, 1996). Drei kommerziell erhältliche ELISAs (HerdChek[®], ParaChek[®], SERELISA[®]) erreichten bei der Verwendung des kulturell-bakteriologischen Kotbefundes als Goldstandard eine Sensitivität zwischen 13,9 % und 27,8 % mit einer Spezifität zwischen 90,1 % und 97,6 % (McKenna *et al.*, 2006). Eine niedrigere Sensitivität zwischen 6,9 % und 16,9 % bei vergleichbarer Spezifität (90,6 % bis 97,6 %) wurde erreicht, wenn die kulturell-bakteriologischen MAP-Befunde der Proben von Ileum- und Darmlymphknoten zugrunde gelegt wurden.

Die Sensitivität der MAP-spezifischen ELISA-Systeme ist auch abhängig vom Infektionsstadium, in dem sich das Rind zum Zeitpunkt der Probennahme befindet (Ridge *et al.*, 1991; Whitlock *et al.*, 2000; Dargatz *et al.*, 2001; Kalis *et al.*, 2002). Köhler *et al.* (2008) verglichen die Ergebnisse von 5 kommerziell erhältlichen ELISAs

(Pourquier[®], Svanovir[®], HerdChek[®], SERELISA[®], ID Screen[®]) miteinander. Dabei wurden Serumproben von Rindern im klinisch apparenten (n = 32) und im klinisch inapparenten Stadium der MAP-Infektion (n = 62) getestet. Unter den klinisch kranken Rindern erreichte der Pourquier[®]-ELISA eine Sensitivität von 77,4 % und unter den klinisch inapparenten infizierten Tieren 33,9 %. Der Svanovir[®]-ELISA war hier mit 90,3 % bzw. 54,8 % sensitiver. In einer anderen Studie wurden 35 Rinderserumproben in einem ELISA, welcher von Milner *et al.* (1987) entwickelt worden war, untersucht (Billman-Jacobe *et al.*, 1992). Bei Rindern mit Paratuberkulose-Symptomen (n = 10) erreichte der ELISA eine Sensitivität von 80 %, bei klinisch unauffälligen Ausscheidern (n = 15) nur von 26,6 %.

Wie in der KBR und im AGIDT ist auch der im ELISA ermittelte MAP-spezifische Antikörpertiter positiv mit der Menge des mit dem Kot ausgeschiedenen Erregers korreliert (de Lisle *et al.*, 1980; de Lisle *et al.*, 1980). Dies wiederum steht mit dem Infektionsstadium in Zusammenhang. So konnte eine positive Korrelation zwischen der Sensitivität eines mit LAM beschichteten ELISAs und der Menge des Erregers im Kot festgestellt werden (Sweeney *et al.*, 1995). Für „starke“ MAP-Ausscheider (> 10 KbE/2 g Kot) betrug die Sensitivität 75 %, für „schwache“ MAP-Ausscheider (< 10 KbE/2 g Kot) nur 15 %. Ähnliche Ergebnisse erzielten Kalis *et al.* (2002), bei denen die Sensitivität eines kommerziellen ELISA bei „schwachen“ MAP-Ausscheidern (1-10 KbE/2 g Kot) 19 % und bei „starken“ MAP-Ausscheidern (> 100 KbE/2 g Kot) dagegen 75 % betrug.

Aufgrund der langen Inkubationszeit der Paratuberkulose ist eine Zunahme des MAP-spezifischen Antikörpertiters mit dem Alter der Rinder zu beobachten (Jakobsen *et al.*, 2000). Auch der Anteil der ELISA-positiven Tiere steigt mit dem Alter zunächst an. So waren die ELISA-Titer bei Kühen ab der zweiten Laktation signifikant höher als bei Kühen in der ersten Laktation (van Schaik *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung von 15.882 Rindern in 378 Betrieben war der Anteil ELISA-positiver Tiere in der Altersgruppe der 5- bis 6-jährigen mit 4,5 % am höchsten, dagegen in der jüngsten Altersgruppe mit Rindern im Alter von 3 bis 4 Jahren mit 2,3 % am niedrigsten (Muskens *et al.*, 2003).

Der MAP-spezifische Antikörpertiter einer Kuh scheint aber nicht nur von ihrem Alter abzuhängen, sondern auch davon, in welcher Phase der Laktation die Serumprobe gezogen wurde (van Schaik *et al.*, 2003). Die niedrigsten MAP-spezifischen ELISA-Titer wurden bei Kühen in den ersten 15 Tagen der Laktation festgestellt (van Schaik *et al.*, 2003). Bis zum 60. Tag nahm dieser Titer stetig zu und blieb dann bis zum Ende der Laktation konstant auf dem erreichten Level. In der Trockenstehperiode bis hin zur Geburt nahmen die MAP-spezifischen Antikörpertiter wieder ab.

Der MAP-spezifische Antikörpertiter eines Rindes unterliegt auch der täglichen Schwankung. So variierten die MAP-spezifischen IgG-Titer bei 3 weiblichen Rindern, welche über einen Zeitraum von 30 Tagen untersucht wurden, von Tag zu Tag mit einer Standardabweichung bis zu 47 % um den 30-Tage-Mittelwert (Barrington *et al.*, 2003). Die Autoren vermuteten, dass unterschiedlich starke Verluste an Immunglobulinen über den Magen-Darm-Trakt für diese Variabilität ursächlich waren.

Die physiologischen Stoffwechselvorgänge vor und nach der Geburt eines Kalbes haben einen großen, antigenunspezifischen Einfluss auf den Serumimmunglobulinspiegel der Mutter und wirken sich damit ebenfalls auf den möglicherweise vorhandenen MAP-spezifischen Antikörpertiter aus. Dabei wurden für die verschiedenen Antikörpersubtypen unterschiedliche Schwankungen des Serumspiegels beobachtet (Dettileux *et al.*, 1995). So nehmen im Serum gemessenes IgM und IgG₁ 5 Wochen vor der Geburt bis unmittelbar vor der Geburt kontinuierlich um bis zu 7 % bzw. 62 % ab. Der IgG₂-Spiegel zeigte keine Veränderung. Nach der Geburt stiegen die Serumspiegel der Antikörper wieder an. Der starke Abfall des IgG₁-Spiegels ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Antikörper in der Milchdrüse zur Bildung des IgG₁-reichen Kolostrums herangezogen werden (Sohal *et al.*, 2008). Deshalb wird auch der MAP-spezifische Antikörpertiter von der Geburt beeinflusst. Stabel und Goff (2004) zeigten in einer ELISA-gestützten Verlaufsuntersuchung an 12 seropositiven Kühen, dass der MAP-spezifische Antikörpertiter bis zum Tag der Geburt um 55 % fiel. Der ursprüngliche Titerwert wurde erst wieder 14 Tage *post partum* erreicht.

Tabelle 2: In Deutschland eingesetzte ELISA-Verfahren

ELISA	Firma	Antigen	Präad- sorption	Zulas- sungsnr.	Status	Quelle
Cattletype® MAP Ab	LDL, Leipzig	„MAP- Antigen“	MP	FLI-B 471	zugelassen, erhältlich	GH ⁶
Herd-Chek® M. paratuberculosis Antibody Kit	IDEXX, Ludwigsburg	Ganzzell- antigen	MP	-	Produktion seit 2007 eingestellt ³	PM ⁷
ID Screen® Paratuberculosis Indirect	ID VET, Montpellier	„MAP- Extrakt“	MP	FLI-B 443	zugelassen, erhältlich	GH ⁶
PARACHEK®2 Antibody ELISA	Prionics, Zürich	„MAP- Antigen“	MP	FLI-B 477	zugelassen, erhältlich	GH ⁶
Pourquier® ELISA Paratuberculosis	IDEXX, Ludwigsburg	PPA ¹	MP	BGVV-B 263	zugelassen, erhältlich	GH ⁶
SERELISA® M. ParaTb Ab Mono Indirect	SYNBIOTICS Europe, Lyon	PPA	-	-	Produktion seit 2008 eingestellt ⁴	GH ⁶
Svanovir® Para-TB-Ab	Svanova, Uppsala	LAM ²	-	-	Produktion seit 2008 eingestellt ⁵	GH ⁶

Erläuterungen:

- 1 protoplasmatisches Antigen
- 2 Lipoarabinomannan
- 3 Heine, IDEXX, 2009, persönliche Mitteilung
- 4 Schneider, Synbiotics, 2009, persönliche Mitteilung
- 5 Schröder, LDL, 2008, persönliche Mitteilung
- 6 Gebrauchsinformation Hersteller
- 7 Heine, IDEXX, 2009, persönliche Mitteilung

Tabelle 3: Sensitivität und Spezifität verschiedener kommerziell erhältlicher ELISA-Systeme (Kotkultur als Goldstandard)

ELISA	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Anzahl der Tiere ¹	Referenzen
Svanovir®	27,8-70	76,0-90,1	396-994	Böttcher und Gangl, 2004; McKenna <i>et al.</i> , 2005; Köhler <i>et al.</i> , 2008
Pourquier®	28,0-72,0	92,0-100	66-2.748	Böttcher und Gangl, 2004; Collins <i>et al.</i> , 2005; McKenna <i>et al.</i> , 2005; Fry <i>et al.</i> , 2008; Köhler <i>et al.</i> , 2008; Shin <i>et al.</i> , 2008; Leroy <i>et al.</i> , 2009
HerdChek®	16,6-55,5	94,9-99,7	396-2.748	Sweeney <i>et al.</i> , 1995; Stabel <i>et al.</i> , 2002; Böttcher und Gangl, 2004; Collins <i>et al.</i> , 2005; McKenna <i>et al.</i> , 2005; Fry <i>et al.</i> , 2008; Köhler <i>et al.</i> , 2008; Shin <i>et al.</i> , 2008
SERELISA®	40,0-45,5	84,7-94,8	396-2.453	Collins <i>et al.</i> , 2005; Köhler <i>et al.</i> , 2008; Shin <i>et al.</i> , 2008
ID Screen®	41,5-58,2	99,3-99,4	396-398	Fry <i>et al.</i> , 2008; Köhler <i>et al.</i> , 2008
Parachek® ²	23,5-37,7	95,0-99,7	398-2.453	Reichel <i>et al.</i> , 1999; Collins <i>et al.</i> , 2005; Lombard <i>et al.</i> , 2006; McKenna <i>et al.</i> , 2006; Fry <i>et al.</i> , 2008; Shin <i>et al.</i> , 2008
John's Absorbed® ³	43,4-48,8	99,0-99,8	346-1.041	Collins <i>et al.</i> , 1991; Ridge <i>et al.</i> , 1991; Sockett <i>et al.</i> , 1992

Erläuterungen:

¹
^{2,3}

Rinder im Alter von über 2 Jahren
 Nur in den USA zugelassene ELISA-Kits:
 Parachek®-ELISA: Biocor Animal Health, Omaha
 Nebraska, übernommen von Pfizer Animal Health
 John's Absorbed®-ELISA: Commonwealth Serum
 Laboratories, Parkville, Victoria, Australien

3.4 Durchflusszytometrie-basierter Antikörpernachweis

Von Eda *et al.* (2005) wurde erstmals eine Methode zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper publiziert, welche auf der Durchflusszytometrie (DFZM) basiert. Bei dieser Methode wurden intakte MAP-Bakterien mit den zu untersuchenden Rinderserumproben inkubiert. Anschließend wurden die an die Bakterien gebundenen IgG-Antikörper durchflusszytometrisch detektiert und quantifiziert. Mit dieser Methode konnten MAP-spezifische Antikörper bei Kälbern schon ab dem 170. Tag nach intratonsillärer Inokulation nachgewiesen werden. Im Vergleich zu dem kommerziell erhältlichen HerdChek[®]-ELISA war die DFZM-Methode sensitiver und ermöglichte eine Unterscheidung zwischen MAP- und MAA-infizierten Kälbern. Natürlich mit MAP infizierte Rinder wurden mit der DFZM-Methode 6 bis 44 Monate früher als mit dem kulturell-bakteriologischen MAP-Nachweis in Kotproben erkannt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung lieferten den Anstoß zu den tierexperimentellen Untersuchungen, die in der hier vorliegenden Dissertation beschrieben sind.

III Material und Methoden

1 Bakterienstämme

Als Infektionserreger für den Tierversuch und als Antigen (Messpartikel) für die Durchflusszytometrie (DFZM) wurde der *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)-Stamm K10 verwendet. Als Kontroll- und Präadsorptionsantigene stand für die durchflusszytometrischen Antikörper-Tests (DFZM-Ak-Tests) je ein Stamm von *Myco-bacterium avium* subsp. *avium* (MAA) und *Mycobacterium phlei* (MP) zur Verfügung. Zur Etablierung der DFZM-basierten Zellzählung wurde außerdem der *Escherichia coli*-Stamm C600 eingesetzt. Eine Übersicht der verwendeten Bakterienstämme ist in **Tabelle 4** aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm	ursprünglich isoliert aus	Herkunft
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	K10 (ATCC BAA-968)	Rinderkot	ATCC
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC 25291	Leber (Huhn)	DSMZ (Nr. 44156)
<i>Mycobacterium phlei</i>	ATCC 43239	k.A.	DSMZ (Nr. 43239)
<i>Mycobacterium</i> <i>scrofulaceum</i>	ATCC 19981	Lymphknoten Mensch	DSMZ (Nr. 43992)
<i>Escherichia coli</i>	C600	attenuierter Laborstamm	Karch ¹

Erläuterungen:

ATCC:	American Type Culture Collection, Manassas, USA
DSMZ:	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
k.A.:	keine Angaben
¹	Prof. Dr. Dr. h.c. Helge Karch, Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster

2 Betriebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Kühe aus insgesamt 8 vorberichtlich MAP-negativen und zwei Paratuberkulose-Problembetrieben beprobt (**Tabelle 5**). Bei den Betrieben handelte es sich ausschließlich um Milchviehbetriebe in Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. In den 8 vorberichtlich MAP-negativen Betrieben wurden alle Tiere im Alter von über 24 Monaten nach dem unten genannten Beprobungsschema beprobt. In den Paratuberkulose-Problembetrieben wurde nur eine Auswahl von Tieren beprobt.

2.1 MAP-unverdächtige Rinderbetriebe

Die Akquirierung MAP-negativer Kälber für die experimentelle Infektionsstudie erfolgte aus MAP-unverdächtigen Betrieben. Zur Identifizierung solcher Rinderbetriebe wurde in Kooperation mit den Arbeitsgruppen der Klinik für Wiederkäuer und Schweine (KWS) und dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (IFTN) in Gießen ein 3-stufiges Auswahlverfahren etabliert. Dieses umfasste eine Vorauswahl geeigneter Betriebe, eine blutserologische Untersuchung (Erst- und evtl. Wiederholungsuntersuchung) sowie eine kulturell-bakteriologische Untersuchung (Kotuntersuchung) aller weiblichen Rinder im Alter von über 24 Monaten.

Vorauswahl. In die Vorauswahl gelangten nur Betriebe, die folgende Kriterien erfüllten:

- Rasse Deutsche Holstein
- Milchviehbetriebe
- Erreichbarkeit des Betriebes in weniger als 3 Stunden Fahrtzeit mit dem PKW
- Remontierung der Herde aus eigener Nachzucht (lt. Angabe der Betriebsleiter)
- Bisher keine Paratuberkulosefälle oder kulturell-bakteriologisch bestätigte MAP-Infektionen [Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) Gießen, persönliche Mitteilung an Dr. T. Seeger, KWS, JLU Gießen]
- Bereitschaft des Betriebinhabers, weibliche Kälber abzugeben

Erstuntersuchung. In Betrieben, welche die Kriterien der Vorauswahl erfüllten, wurden allen weiblichen Rindern im Alter von über 24 Monaten Blutproben entnommen und dem vorher festgelegten Beprobungsschema unterzogen (**Abbildung 1**). Dazu wurden die Serumproben mittels Svanovir®-ELISA auf MAP-spezifische Antikörper untersucht. Tiere mit positivem oder fraglichem Testergebnis wurden im Pourquier®-

ELISA nachgetestet. Bei einem Pourquier®-positiven oder -fraglichen Ergebnis wurde der Betrieb nicht weiter untersucht und erhielt den Status MAP-verdächtig.

Wiederholungsuntersuchung. Nur wenn die Svanovir®-positiven und -fraglichen Rinder eines Betriebes alle im Pourquier®-negativ reagierten, wurden sie - analog zur Erstuntersuchung - einer zweiten serologischen Untersuchung unterzogen. Bei einem Pourquier®-positiven oder -fraglichen Ergebnis wurde der betroffene Betrieb nicht weiter untersucht und erhielt den Status MAP-verdächtig.

Kotuntersuchung. Anschließend an die Erst- und Wiederholungsuntersuchung wurde allen Rindern über 24 Monaten eine Kotprobe entnommen und diese im IFTN kulturell-bakteriologisch und molekularbiologisch auf das Vorhandensein von MAP untersucht. Ein Betrieb erhielt den Status MAP-unverdächtig, wenn alle untersuchten Rinder einer Herde in der serologischen Untersuchung Svanovir®-negativ oder Pourquier®-negativ waren und alle kulturell-bakteriologischen sowie molekularbiologischen Kotuntersuchungen im Betrieb negativ ausfielen. Reagierte auch nur ein untersuchtes Rind in der kulturell-bakteriologischen und/oder molekularbiologischen Kotuntersuchung positiv, galt der Betrieb als MAP-verdächtig.

Zweituntersuchung. Um den MAP-Status der MAP-unverdächtigen Betriebe zu überprüfen, wurden ein bis eineinhalb Jahre nach der Erstuntersuchung erneut alle Rinder im Alter von über 24 Monaten serologisch untersucht. Die Zweituntersuchung folgte dem Prinzip der Erstuntersuchung (siehe oben), die Wiederholungsuntersuchung wurde jedoch nicht vorgenommen. Kotproben wurden lediglich von Tieren entnommen, die bei der Erstuntersuchung jünger als 24 Monate alt waren und dementsprechend noch nicht beprobt worden waren. Ein Betrieb wurde als MAP-unverdächtig bestätigt, wenn alle untersuchten Rinder der Herde in der serologischen Untersuchung ein Pourquier®-negatives Ergebnis aufwiesen und die kulturell-bakteriologischen sowie molekularbiologischen Kotuntersuchungen ebenfalls negativ ausfielen.

2.2 MAP-Problembetriebe

Ein Betrieb erhielt den Status eines MAP-Problembetriebes, wenn vorberichtlich in der Vergangenheit klinische Paratuberkulosefälle in diesem Betrieb aufgetreten waren und der Direktnachweis von MAP im Kot eines oder mehrerer Rinder positiv ausgefallen war (Dr. T. Seeger, KWS, JLU Gießen, persönliche Mitteilung).

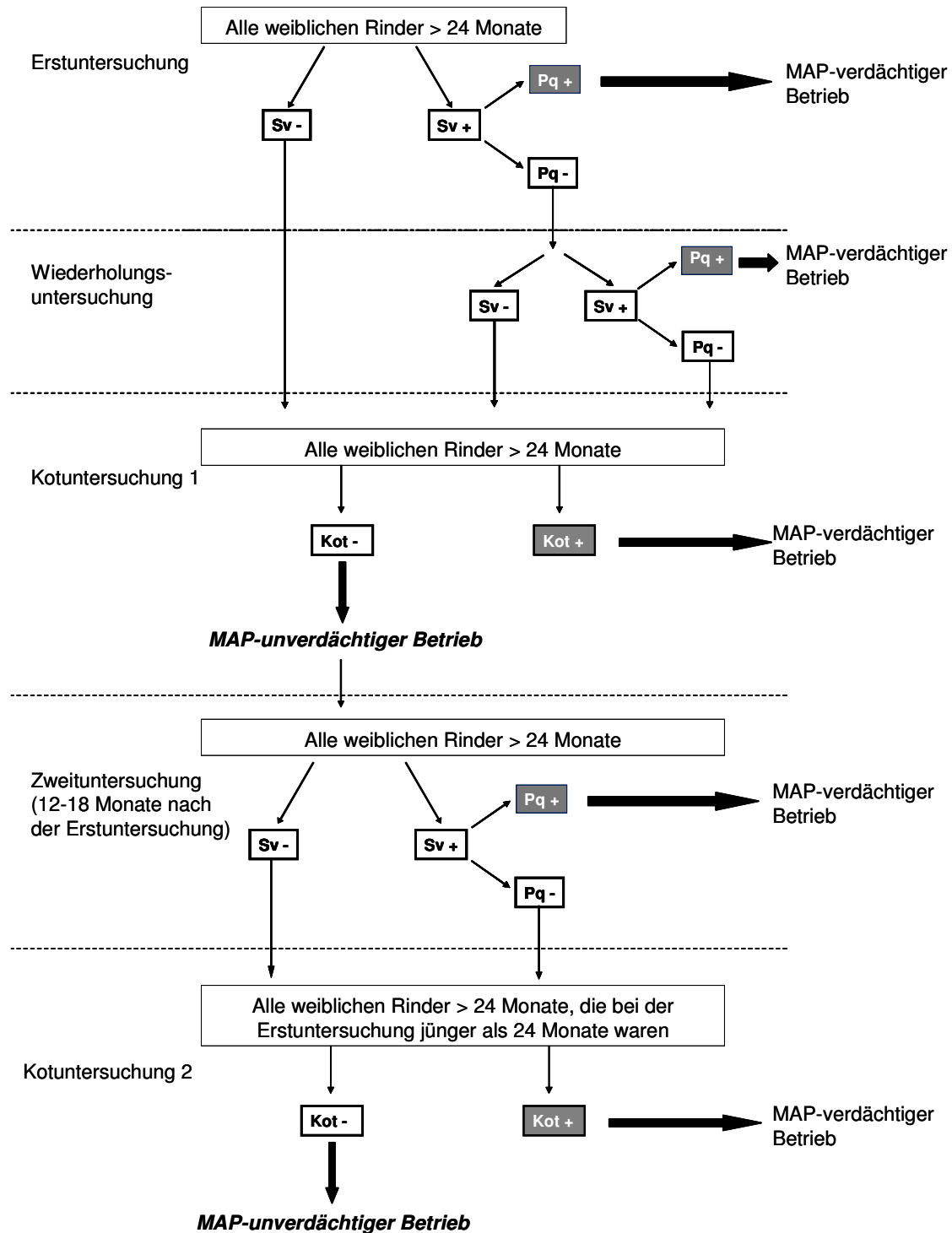


Abbildung 1: Algorithmus zur Identifizierung MAP-unverdächtiger Betriebe

Kot: Direktnachweis von MAP im Kot mittels Kultur und PCR

Pq: Pourquier®-ELISA

Sv: Svanovir®-ELISA

Tabelle 5: Übersicht über die Rinderbetriebe

Betrieb	Bundes- land	Tierzahl ¹	MAP-Status	
			Erstuntersuchung	Zweituntersuchung
<u>vorberichtlich MAP-negative Betriebe</u>				
Betrieb 1	H	42	unverdächtig	unverdächtig
Betrieb 2	RP	65	unverdächtig	unverdächtig
Betrieb 3	H	53	unverdächtig	unverdächtig
Betrieb 4	H	37	unverdächtig	verdächtig
Betrieb 5	H	62	verdächtig	n.b.
Betrieb 6	H	49	verdächtig	n.b.
Betrieb 7	H	13	verdächtig	n.b.
Betrieb 8	H	52	verdächtig	n.b.
<u>MAP-Problembetriebe</u>				
Betrieb 9	H	111	n.b.	n.b.
Betrieb 10	NRW	120	n.b.	n.b.

Erläuterungen:

¹ weibliche Rinder im Alter von über 24 Monaten

H: Hessen

n.b.: nicht bestimmt

NRW: Nordrhein-Westfalen

RP: Rheinland-Pfalz

3 Rinder

3.1 Kühe

MAP-negative Kühe (n = 22) wurden anhand ihrer Herkunft aus den 4 MAP-unverdächtigen Betrieben 1 (n = 6), 2 (n = 6), 3 (n = 5) und 4 (n = 5) definiert, welche im Zuge der Betriebsuntersuchungen identifiziert worden waren (siehe **Kapitel III2.1**). MAP-positive Kühe (n = 18) wiesen einen positiven Direktnachweis von MAP im Kot (Kultur- und/oder PCR-Nachweis) auf. Sie standen in den oben genannten MAP-Problembetrieben 9 (n = 8) und 10 (n = 7) sowie in den im Rahmen der Betriebsuntersuchungen als MAP-verdächtig identifizierten Betrieben 5 (n = 1) und 6 (n = 2).

3.2 Kälber der experimentellen Infektionsstudie

Im Rahmen der experimentellen Infektionsstudie wurden insgesamt 14 Kälber aus 4 MAP-unverdächtigen Betrieben erworben (**Tabelle 6**); 7 Kälber bildeten die Kontrollgruppe, die anderen 7 Kälber wurden experimentell mit MAP infiziert (Infektionsgruppe).

Die Muttertiere der Kälber waren 4 bis 7 Tage nach der Geburt mit jeweils negativem Ergebnis sowohl serologisch (Blut) auf MAP-Antikörper mittels Pourquier®-ELISA als auch kulturell-bakteriologisch und molekularbiologisch (Kot) auf MAP untersucht worden.

Tabelle 6: Auflistung der in der Kontroll- und der Infektionsgruppe verwendeten Kälber

Bezeichnung	Geburtsdatum	Herkunftsbetrieb	erreichtes Alter [d] ²	Kommentar
<u>Kontrollgruppe</u>				
Kalb 1	01.01.2008	3	375	
Kalb 2 †	17.01.2008	2	46	Euthanasie wegen eines idiopathischen Ileus
Kalb 3	31.01.2008	2	387	
Kalb 4	11.02.2008	2	377	
Kalb 5	08.03.2008	3	357	
Kalb 6	18.03.2008	3	368	
Kalb 7	19.03.2008	1	368	
<u>Infektionsgruppe</u>				
Kalb 8	26.10.2008	1	377	
Kalb 9 †	31.10.2008	1	23	Direktnachweis von MAP im Kot (9. LT) ¹
Kalb 10	06.11.2008	4	366	
Kalb 11 †	20.11.2008	4	253	Euthanasie wegen hochgradiger Peritonitis
Kalb 12	25.11.2008	2	361	
Kalb 13	17.12.2008	2	385	
Kalb 14	10.01.2009	2	372	

Erläuterungen:

†

¹²

frühzeitig aus der Studie ausgeschieden
 entspricht der „Nullprobe“ vor der Inokulation
 Alter bei Beendigung der Studie bzw. beim Ausscheiden
 aus der Studie

3.3 Kälber der Feldstudien

3.3.1 Kohortenstudie 1

Im Rahmen der Kohortenstudie 1 wurden insgesamt 12 weibliche Kälber des MAP-Problembetriebes 9 ab der 1. oder 2. Lebenswoche untersucht. In Abhängigkeit davon, wie die Kälber nach der Aufnahme von Kolostrum im DFZM-IgG-Test reagierten, wurden sie der Gruppe der Kälber mit initialen MAP-Antikörpertitern („positive“ Kälber) oder der Gruppe ohne initiale MAP-Antikörpertiter („negative“ Kälber) zugeordnet. Jede Gruppe umfasste 6 Kälber. Die Cut Off-Werte zur Differenzierung zwischen „positiven“, „fraglichen“ und „negativen“ Antikörpertitern wurden anhand der bei den Kontrolltieren in der experimentellen Infektionsstudie ermittelten Messwerte errechnet. Die berechneten Cut Off-Werte sind in der **Tabelle 18** (auf Seite 97) aufgelistet.

Bei 10 Kälbern erfolgte die erste Beprobung in der ersten Lebenswoche. Zwei Kälber wurden erstmalig in der dritten Lebenswoche beprobt. Danach wurden die Kälber in einem Abstand von 4 bis 6 Wochen über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten wiederholt einer serologischen Untersuchung unterzogen. Zusätzlich wurden die Muttertiere der Kälber mindestens zweimal im Abstand von 2 Monaten beprobt (Kot- und Serumproben).

3.3.2 Kohortenstudie 2

Im Rahmen der Kohortenstudie 2 wurden Serum- und Kotproben von 24 weiblichen Jungrindern aus dem MAP-Problembetrieb 9 und von 10 weiblichen Jung- rindern aus dem MAP-unverdächtigen Betrieb 3 entnommen (**Tabelle 7**). Die erste Probennahme erfolgte frühestens im Alter von 7 Lebensmonaten. Anschließend fanden 4 bis 5 weitere Beprobungen im Abstand von 3 Monaten statt, bis die Tiere ein Alter zwischen 20 bis 22 Lebensmonaten erreicht hatten.

Tabelle 7: Tierdaten der Rinder aus den Kohortenstudien

Bezeichnung	Geburts- datum	Pq-Ergebnis des Muttertieres	Betrieb	Kohorten- studie
Feld K2 / Rind 1	17.01.08	-	9	1, 2
Feld K3 / Rind 2	13.02.08	-	9	1, 2
Feld K4 / Rind 3	10.02.08	-	9	1, 2
Feld K5 / Rind 6	01.03.08	+	9	1, 2
Feld K6 / Rind 7	27.03.08	-	9	1, 2
Feld K9	16.05.09	-	9	1
Feld K10	29.06.09	-	9	1
Feld K11	28.06.09	-	9	1
Feld K12	23.06.09	-	9	1
Feld K13	16.07.09	+	9	1
Feld K14	19.07.09	-	9	1
Feld K15	21.11.09	-	9	1
Rind 4	04.02.08	-	9	2
Rind 5	08.03.08	-	9	2
Rind 8	18.03.08	-	9	2
Rind 9	21.03.08	-	9	2
Rind 10	28.02.08	k.P.	9	2
Rind 11	19.02.08	k.P.	9	2
Rind 12	28.03.08	-	9	2
Rind 13	24.04.08	?	9	2
Rind 14	26.02.08	-	9	2
Rind 15	21.04.08	-	9	2
Rind 16	29.03.08	k.P.	9	2
Rind 17	12.03.08	-	9	2
Rind 18	23.05.08	+	9	2

Fortsetzung und Erläuterung der **Tabelle 7** auf der nächsten Seite

Tabelle 7 (Fortsetzung):

Bezeichnung	Geburtsdat.	Pq-Ergebnis Muttertier	Betrieb	Studie
Rind 19	25.04.08	-	9	2
Rind 20	10.05.08	-	9	2
Rind 21	22.04.2008	-	9	2
Rind 22	26.05.08	-	9	2
Rind 23	18.05.08	k.P.	9	2
Rind 24	15.07.08	+	9	2
Rind 25	22.04.08	-	3	2
Rind 26	02.05.08	+	3	2
Rind 27	26.04.08	-	3	2
Rind 28	14.05.08	-	3	2
Rind 29	04.04.08	k.P.	3	2
Rind 30	10.05.08	-	3	2
Rind 31	16.05.08	-	3	2
Rind 32	24.06.08	-	3	2
Rind 33	26.07.08	-	3	2
Rind 34	28.05.08	-	3	2

Erläuterungen:

k.P.: keine Probe vorhanden
 Pq: Pourquoi[®]-ELISA
 -: negativer Pourquoi[®]-Titer ($\leq 60\%$)
 ? : fraglicher Pourquoi[®]-Titer ($> 60\%$ und $< 70\%$)
 +: positiver Pourquoi[®]-Titer ($\geq 70\%$)

4 Experimentelle Infektionsstudie

In Form einer Longitudinalstudie wurden insgesamt 14 Kälber aus 4 MAP-unverdächtigen Betrieben erworben und über den Zeitraum von einem Jahr regelmäßig beprobt. Sieben Kälber bildeten die Kontrollgruppe, die anderen 7 Kälber wurden experimentell mit MAP infiziert (Infektionsgruppe). Mit den zwei Kälbergruppen wurde zeitlich um 10 Monate versetzt begonnen.

Unterbringung. Alle Kälber wurden zur Eingewöhnung zwischen dem 4. und 7. Lebenstag im Isolierstall der KWS untergebracht. Die Pflege der Kälber erfolgte durch ausgebildetes Personal. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Kälbern der Kontroll- und der Infektionsgruppe in der Klinik (getrennte Stallungen) wurden diese von jeweils eigenen Teams versorgt. Bis zur 5. W.p.i. wurden die Kälber in Einzelhaltung, danach paarweise in einer mit Stroh eingestreuten Box gehalten. Nachdem sich das jeweils jüngste Kalb der Gruppe von der 4. Operation (24 W.p.i.) erholt hatte, wurde die gesamte Gruppe in ein außerhalb der Rinderklinik gelegenes Stallgebäude umgestallt. Alle 6 Tiere wurden dort zusammen in einer großen Laufbox mit Stroheinstreu unter Isolierstallbedingungen gehalten.

Fütterung. Die Kälber hatten permanenten Zugang zu frischem Wasser, das über Eimer- bzw. Selbsttränke zugeführt wurde. Zusätzlich verfügte jede Box über einen Mineralleckstein. Die Kälber wurden dreimal täglich mit jeweils 2 bis 3 Liter Milchaustauscher getränkt. Frühestens in der Woche nach der dritten Operation (ab 12 W.p.i.) wurden die Kälber abgesetzt. Heu wurde den Kälbern ab dem Tag der Aufstallung im Isolierstall angeboten. Kraftfutter wurde langsam bis zur maximalen Menge von ca. 2 kg pro Tag und Kalb angefüttert.

Inokulation. Die Inokulation der MAP-Suspension erfolgte dreimal im Abstand von je 2 Tagen am 10., 12. und 14. Lebenstag. Die Kälber aus der Infektionsgruppe erhielten Inokula, welche mit einer definierten Menge an MAP-Bakterien versetzt waren (Herstellung siehe **Kapitel III 8.4**), die Kontrolltiere erhielten Scheininokula. Alle Kälber nahmen die Inokula freiwillig, selbständig und vollständig auf.

Beprobungsschema. Allen Kälbern wurden zu den jeweils gleichen definierten Zeitpunkten Darmlymphknotenbiopate, Kot-, Vollblut- und Serumproben entnommen. Die Beprobungshäufigkeit und die -intervalle sind in **Abbildung 2** dargestellt. Alle Proben einschließlich der Biopate wurden von Mitarbeitern der KWS entnommen. Die „Nullprobe“ (Kot-, Vollblut- und Serumprobe) wurde einen Tag vor der ersten Inokulation (9. Lebenstag) gewonnen. Darmlymphknotenbiopate wurden in der 2., 4.,

12. und 24. Woche *post infectionem* (W.p.i.) sowie am Tag der Euthanasie entnommen. In den ersten 2 Wochen nach den Inokulationen wurden Kotproben in zweitägigem Abstand entnommen, danach erfolgten 2 Beprobungen im wöchentlichen Abstand. Anschließend wurde ein 14-tägiger Beprobungsrhythmus bis zum Ende der Studie fortgeführt. Vollblutproben wurden im 4-Wochen-Rhythmus gewonnen. Serumproben für den MAP-spezifischen Antikörpernachweis (Pourquier®-ELISA, DFZM-Ak-Tests) wurden 14-tägig entnommen. In der $52. \pm 3$ W.p.i. wurden die Kälber euthanasiert und einer pathologischen Untersuchung unterzogen (in Kooperation mit den Mitarbeitern des Institut für Veterinärpathologie, der KWS und des IFTN, JLU Gießen).

Klinische und labordiagnostische Untersuchungen. Bei der Einstellung wurden die Kälber einer klinischen Untersuchung unterzogen sowie Laborparameter (Blutbild, Blutgase, Elektrolyte, Mengen- und Spurenelemente) bestimmt. Außerdem wurde der Kot am Tag der Einstellung und 2 Tage darauf erneut auf Kryptosporidien untersucht. Bei allen Kälbern wurde bis zum 6. Lebensmonat dreimal täglich, danach zweimal täglich die Körpertemperatur rektal gemessen. Alle Kälber wurden einmal täglich einer klinischen Untersuchung unterzogen. Die labordiagnostischen Parameter wurden am Tag vor und nach jeder Operation bestimmt. Das Gewicht der Kälber wurde bei Einstellung, vor jeder Operation und am Tag der Euthanasie gemessen. Alle klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen wurden von Mitarbeitern der KWS durchgeführt.

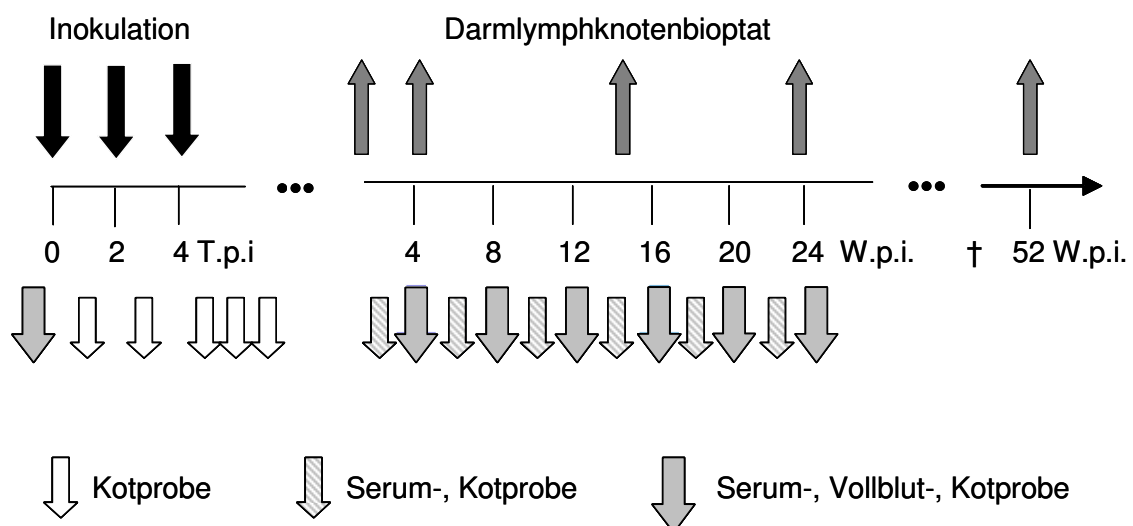


Abbildung 2: Beprobungsschema in der experimentellen Infektionsstudie

T.p.i.: Tage *post infectionem*

W.p.i.: Wochen *post infectionem*

5 Serumproben

Bei Rindern im Alter von über 6 Monaten erfolgte die Blutentnahme durch die Punktion der Schwanzvene. Bei Kälbern der Kohortenstudie 1 im Alter von unter 6 Monaten und den Kälbern aus der Infektionsstudie wurde die Vena jugularis punktiert. Das Blut wurde in 10 ml Serumröhrchen aufgefangen und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das Blut wurde am Tag der Entnahme in den Serumröhrchen bei 2.700 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Tischzentrifuge Rotina 35, Fa. Hettich über MAGV). Der Überstand (Serum) wurde abgenommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Alle Seren wurden vor ihrer Verwendung im Durchflusszytometer in einem Wasserbad bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert.

6 Kotproben

Kotproben wurde mit Einmalhandschuhen direkt aus dem Rektum der Rinder entnommen und unmittelbar in ein Drehdeckelgefäß überführt. Die kulturell-bakteriologische und/oder molekularbiologische Untersuchung auf MAP erfolgte im IFTN.

7 Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

8 Bakteriologische Methoden

8.1 Anzucht der Bakterienstämme

Die lyophilisierten Mykobakterienstämme wurden nach Anleitung des Herstellers in 1 ml A. dest. (MAP) bzw. Middlebrook 7H9 (MB7H9)-Medium (MAA, MP) suspendiert und anschließend in 9 ml MB7H9-Medium überführt. Davon wurden 9 ml entweder mit 15 % Glycerin oder direkt in Kryotubes á 500 µl aliquotiert und bei -70 °C bzw. in N₂ gelagert. 100 µl der verbleibenden Bakteriensuspension wurde jeweils in Glasfläschchen mit Schraubdeckel in ca. 10 ml MB7H9-Medium 1:100 verdünnt und bei 37 °C inkubiert. Zur phänotypischen Verifizierung und Reinheitsprüfung wurde der

MAP K10-Stamm neben der Kultivierung in Flüssigmedium mit dem kommerziell erhältlichen Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM)-Agar angezüchtet (**Abbildung 3**). Die verwendeten Stämme von MAA und MP, deren Wachstum von Mycobactin unabhängig ist, wurden auf dem im Haus hergestellten Löwenstein-Jensen-Schrägar angezüchtet (**Abbildung 4**).

Zur Anzucht von *E. coli* C600 wurden Einzelkolonien von der Reinkultur auf Schafblutagar abgeimpft und in Luria-Bertani-Medium überführt. Die Anzucht erfolgte dann als Schüttelkultur unter aeroben Bedingungen für 14-16 h (37 °C, 180 rpm).

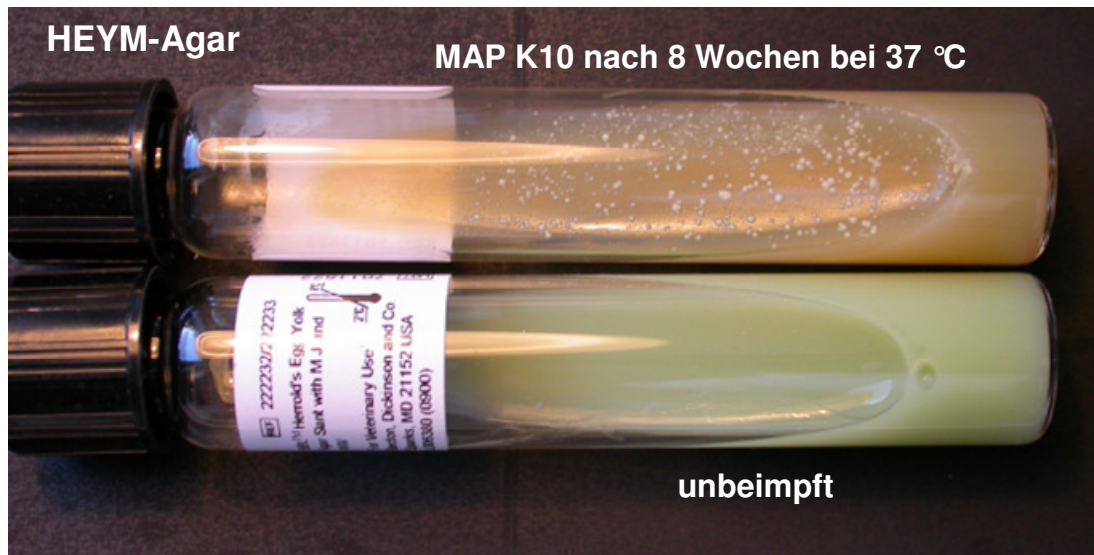


Abbildung 3: Koloniemorphologie des MAP K10-Stammes auf Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM)-Agar



Abbildung 4: Koloniemorphologie der Stämme ATCC 43239 (MP), ATCC 19981 (*M. scrofulaceum*) und ATCC 25291 (MAA) auf Löwenstein-Jensen-Schrägagar nach 4-wöchiger Inkubation bei 37 °C

8.2 Keimzahlbestimmung

8.2.1 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit

Durchführung. Die Durchführung orientierte sich an den Vorgaben des Herstellers. Inkubationszeiten, Waschschritte und eingesetzte Konzentrationen wurden nach den Ergebnissen der Vorversuche angepasst. Von der zu bestimmenden Bakteriensuspension wurden 500 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert und in einer Tischzentrifuge (Mikro 20, Fa. Hettich) bei 16.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet mit 25 µl einer 0,85 %igen NaCl-Lösung resuspendiert wurde. Ein 3 µl-Aliquot dieser Bakteriensuspension wurde anschließend in 281 µl einer 0,85 %igen NaCl-Lösung zusammen mit 0,9 µl einer 1:1-Mischung aus einer SYTO 9- und einer Propidiumjodid-Stammlösung in ein 5 ml FACS-Röhrchen pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) unter Lichtausschluss inkubiert.

Die Bead-Stammsuspension wurde nach dem Vortexen für 5-10 min in einem Ultraschallwasserbad (Fa. Bender & Hohnbein) inkubiert, bevor sie mit der 0,85 %igen NaCl-Lösung 1:5 verdünnt wurde. Von dieser Suspension wurden 15 µl am Ende der 15-minütigen Inkubationszeit zu dem Farbstoff-Bakterien-Gemisch pipettiert.

Das Gemisch aus Bakterien, Beads und Farbstoffen wurde anschließend im FACSCalibur™-Gerät (Fa. Becton Dickinson) analysiert. Nach jeder Messung wurde die Messapparatur mit 0,85 %iger NaCl-Lösung gespült, um möglicherweise dort verbliebene Bakterien und Farbstoff zu entfernen.

Kontrollen. Im Rahmen der Etablierung wurden die Anteile der „lebenden“ und der „toten“ Bakterien einer MAP- und einer *E. coli*-Suspension nach dem beschriebenen Standardprotokoll bestimmt. Die MAP-Kultur wurde zuvor über 8 Wochen bei 37 °C bebrütet. Bei der *E. coli*-Kultur handelte es sich um eine Übernachtskultur des Stammes C600. Zur Überprüfung der Methode wurden die folgenden 3 Kontrollansätze gemessen:

1. Kontrollansatz: mit MAP oder *E. coli*, ohne Farbstoff
2. Kontrollansatz: ohne Bakterien, mit Farbstoff
3. Kontrollansatz: ohne Bakterien und ohne Farbstoff

In allen weiteren Versuchen wurden der 1. und der 2. Kontrollansatz mitgeführt.

Gating-Strategie und Auswertung. Die Messung der Proben und die Darstellung der Messwerte im FACSCalibur™-Gerät erfolgten mit Hilfe des Softwareprogrammes „Cell Quest Pro“ (Fa. Becton Dickinson). Jede Probe wurde so lange

gemessen bis 5.000 Beads erfasst wurden. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Daten mit der Software „FCS Express“ (Version 2, De Novo-Software, Thornhill, Kanada).

In einem ersten Schritt wurden alle Messereignisse (Bakterien und unspezifische Partikel) in einem Punktediagramm (Dotplot) in der Vorwärtslichtstreuung (FSC; forward scatter) und Seitwärtslichtstreuung (SSC; side scatter) unabhängig von ihren Fluoreszenzeigenschaften dargestellt (**Abbildung 5A**). Nach der Auswahl (gaten) der morphologisch intakten Bakterienzellpopulation in einem elektronischen Auswertfenster (R1), erfolgte die Darstellung der in R1 befindlichen Ereignisse in einem Dotplot-Diagramm mit den Fluoreszenzmesskanälen FL1 (SYTO 9) versus FL3 (PI) (**Abbildung 5B**). Darin konnten zwei verschiedene Populationen (R2 und R3) unterschieden werden. Die Darstellung der „lebenden“ Bakterien erfolgte durch die Population R2 mit einer höheren Fluoreszenzintensität im FL1-Kanal (grün). Die andere Population R3 umfasst die „toten“ Bakterien, die weniger SYTO 9-Farbstoff gebunden hatten und eine niedrigere Fluoreszenzintensität im FL1-Kanal aufwiesen.

Eine weitere Darstellung der gemessenen Ereignisse ohne nach R1 zu gaten erfolgte im FL1-versus-SSC-Diagramm (**Abbildung 5C**). In dieser Darstellung ließen sich die Beads als dritte Population (R6) anhand ihrer im Vergleich zu Bakterien größeren Partikelgröße und ihrer Doppelfluoreszenz (rot/grün) abgrenzen. Die Zahl der gemessenen Ereignisse in R2, R3 und R6 bildeten die Grundlage für die Berechnung der Keimkonzentration in einer Probe unter der Verwendung folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Keimkonzentration [Bakterien / ml]} &= \\ &= \frac{\text{Anzahl der Ereignisse eines Messfensters} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl Beads} \times 10^{-6}} \end{aligned}$$

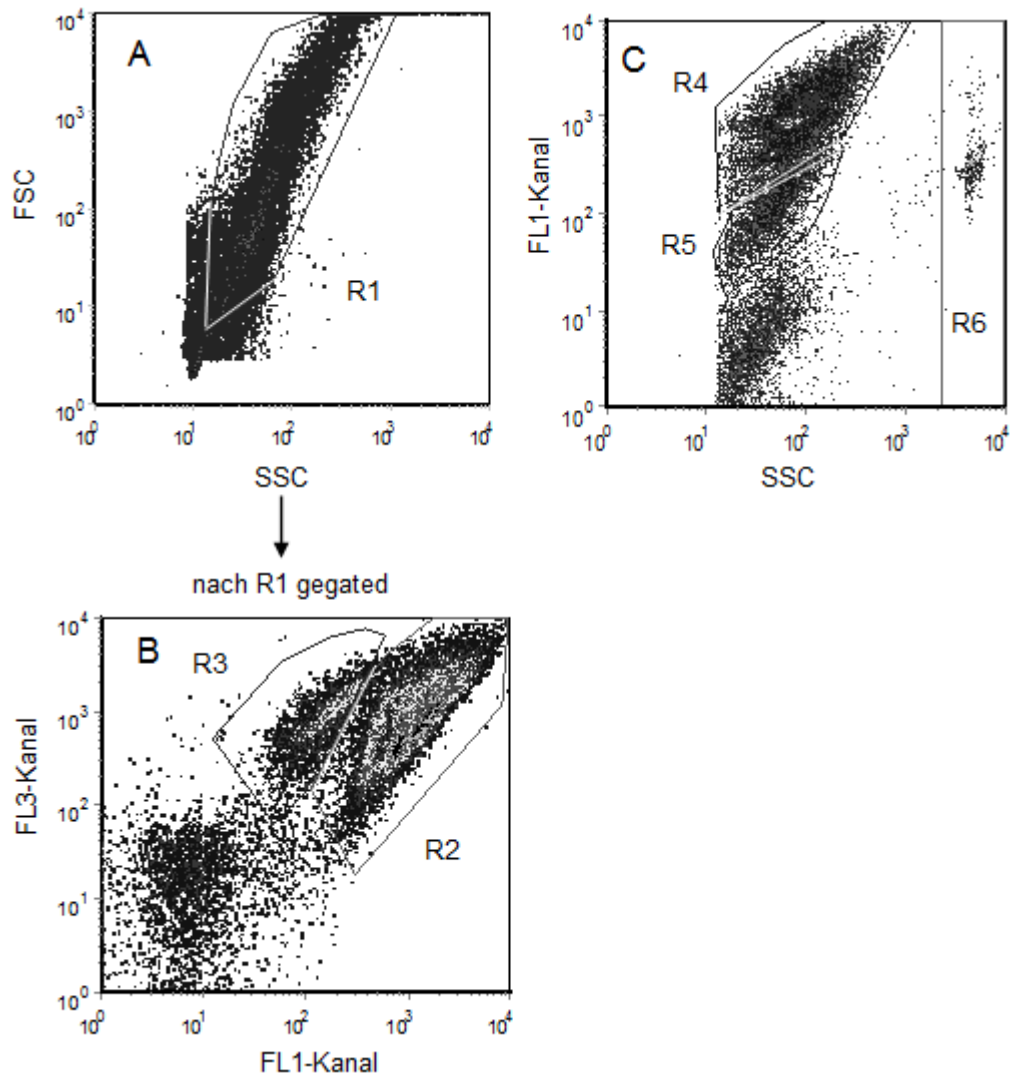


Abbildung 5: Gating-Strategie bei der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse im Durchflusszytometer am Beispiel von MAP-Bakterien

- [A]: MAP-Bakterien in R1 im FSC-versus-SSC-Diagramm
- [B]: „lebende“ (R2) und „tote“ (R3) MAP-Bakterien im FL3-versus-FL1-Diagramm
- [C]: „lebende“ (R4) und „tote“ (R5) MAP-Bakterien sowie Beads (R6) im FL1-versus-SSC-Diagramm

8.2.2 KbE-Bestimmung und OD₆₆₀-Messung

KbE-Bestimmung. Die zu untersuchende MAP-Suspension wurde im Doppelansatz \log_{10} ($1:10^1$ bis $1:10^6$) in einer 0,85 %igen NaCl-Lösung verdünnt. Aus den Verdünnungsstufen $1:10^3$ bis $1:10^6$ wurden je 10 μ l auf eine Middlebrook 7H10-Agarplatte aufgetropft und mit Hilfe eines sterilen Plastikspatels auf der Platte verteilt. Danach wurden die Petrischalen luftdicht verpackt, um ein Austrocknen des Nährbodens während der Bebrütungszeit zu verhindern. Die Ablesung erfolgte nach einer Inkubation von 8 bis 10 Wochen bei 37 °C. Ausgewertet wurden Platten mit 10 bis ca. 200 Kolonien. Die Berechnung der KbE/ml wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Keimkonzentration [KbE / ml]} &= \\ &= \text{Anzahl der MAP-Kolonien je Agarplatte} \times 100 \times \text{Verdünnungsfaktor} \end{aligned}$$

Optische Dichte. Die Bestimmung der optischen Dichte von MAP-Suspensionen in MB7H9-Medium erfolgte bei einer Wellenlänge von 660 nm (Photometer DU® 640; Fa. Beckman Instruments). Eingesetzt wurde 0,5 ml der zu bestimmenden Keimsuspension, als Blank diente unbeimpftes MB7H9-Medium. Proben mit einer OD₆₆₀ > 1 wurden \log_2 verdünnt und erneut gemessen, da OD-Werte > 1 nicht im linearen Messbereich des Photometers lagen. Die Keimzahl wurde anhand der OD₆₆₀ nach folgender Formel berechnet (Dr. Ö. Akineden, IFTN, persönliche Mitteilung):

$$\text{Keimkonzentration [Bakterien / ml]} = \frac{OD_{660} \times 10^8}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

8.3 Herstellung der Test- und Präadsorptionsantigene

Zur Standardisierung der DFZM-Ak-Tests wurden mehrere Chargen von Mykobakterienantigenen hergestellt. Dazu wurden Aliquots (500 μ l) der Bakterien, die bei -70 °C gelagert worden waren, in 500 ml MB7H9-Medium überimpft und diese Kulturen bei 37 °C bebrütet. Die Stämme ATCC BAA-968 (MAP) und ATCC 25291 (MAA) wurden bis zu einer OD₆₆₀ von ca. 0,3 angezüchtet. Die Kultur mit dem Stamm ATCC 43239 (MP) wurde dagegen nur bis zu einer OD₆₆₀ von 0,1 inkubiert, da die MP-Bakteriensuspension bei höheren Werten zu starker Klumpenbildung neigte. Nach Erreichen der oben genannten optischen Dichte wurden die Bakteriensuspensionen á

5 ml (MAP, MAA) bzw. 10 ml (MP) in 15 ml Röhrchen aliquotiert, mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 16,6 % (v/v) versetzt und bei -70 °C gelagert.

8.4 Herstellung der Inokula und Scheininokula

Die Inokula für die Kälber der sogenannten Infektionsgruppe wurden anhand eines zuvor definierten Schemas hergestellt, um eine einheitliche Menge und Qualität an MAP-Bakterien für jedes Tier zu gewährleisten. Das Schema zur Herstellung der Inokula ist in **Abbildung 6** dargestellt.

Ein 500 µl-Aliquot des MAP-Stammes K10 (gelagert bei -70 °C) wurde in 50 ml MB7H9-Medium eingemischt und bei 37 °C inkubiert bis das Medium eine OD₆₆₀ von 0,3 erreicht hatte.

Die Bakteriensuspensionen wurden mit verschiedenen Methoden [Ausstrich auf Blutagar, Ziehl-Neelsen-Färbung, PCR 251 nach Bannantine (2002), Real-Time Duplex PCR (F57 und ISMav2) nach Poupart (1993) und Strommenger (2001), Nested-PCR IS900 nach Bull (2003)] auf die Freiheit von mikrobiellen Kontaminanten und auf die Spezieszugehörigkeit (Identitätsprüfung) des Bakterienstammes geprüft. Die molekularbiologische Überprüfung wurde dabei von Mitarbeitern des IFTN vorgenommen. Bei nachgewiesener Freiheit von mikrobiellen Kontaminanten und der Identifikation von MAP wurden aus dieser sog. „Ausgangssuspension“ 9 x 5 ml-Aliquots hergestellt. Diese wurden bei -70 °C gelagert und stellten die Basis der Inokula für die Infektionsgruppe dar. Acht Wochen vor der ersten Inokulation wurden 4 der 5 ml-Aliquots der Ausgangssuspension aufgetaut und davon je 2,5 ml 1:100 in 250 ml MB7H9-Medium verdünnt. Anschließend wurden diese sog. „Vermehrungskulturen“ bei 37 °C bebrütet bis eine OD₆₆₀ von ca. 0,3 erreicht wurde. Die Vermehrungskulturen bildeten dann das Ausgangsmaterial, um daraus die sog. „Inokulum-Aliquots“ herzustellen. Hierzu wurde das Material der Vermehrungskultur auf eine Keimkonzentration von 1×10^9 „lebender“ Bakterien aufkonzentriert und á 5 ml aliquotiert. Die Anzahl der „lebenden“ Bakterien in den Vermehrungskulturen wurde mithilfe des LIVE/DEAD® BacLight™-Kits bestimmt. Parallel dazu wurden die Kulturen einer KbE-Bestimmung unterzogen.

Nach der zweiten Identitätsprüfung wurden die Inokulum-Aliquots bis zur Verabreichung an die Kälber bei -70 °C gelagert. Genau 24 h vor der Inokulation wurde ein 5 ml Inokulum-Aliquot im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit 20 ml MB7H9-Medium versetzt. Anschließend wurde dieses, nun als sog. „Inokulum-Suspension“ bezeichnete Material bis zum nächsten Tag bei 37 °C inkubiert. Am Tag der Inokulation wurden 500 µl von repräsentativen Inokulum-Suspensionen entnommen und zur

erneuten Kontrolle einer DFZM-(LIVE/DEAD® BacLight™-Kit) sowie einer KbE-basierten Zellzählung zugeführt. Nach Entnahme dieser Stichprobe wurde die Inokulum-Suspension in 1 Liter Milchaustauscher eingerührt und das „Inokulum“ den Kälbern über einen Nuckeleimer oral verabreicht.

Eine Dosis der Scheininokula bestand aus 25 ml Middlebrook 7H9 (MB7H9)-Medium, welches nicht mit MAP beimpft worden war, aber den gleichen Arbeitsschritten des Einfrierens und Auftauens unterzogen worden war wie das MAP-haltige Medium der Inokula. Eine Dosis Inokulum bzw. eine Dosis Scheininokulum wurde jeweils in einen Liter Milchaustauscher eingerührt und den Kälbern über einen Nuckeleimer oral verabreicht.

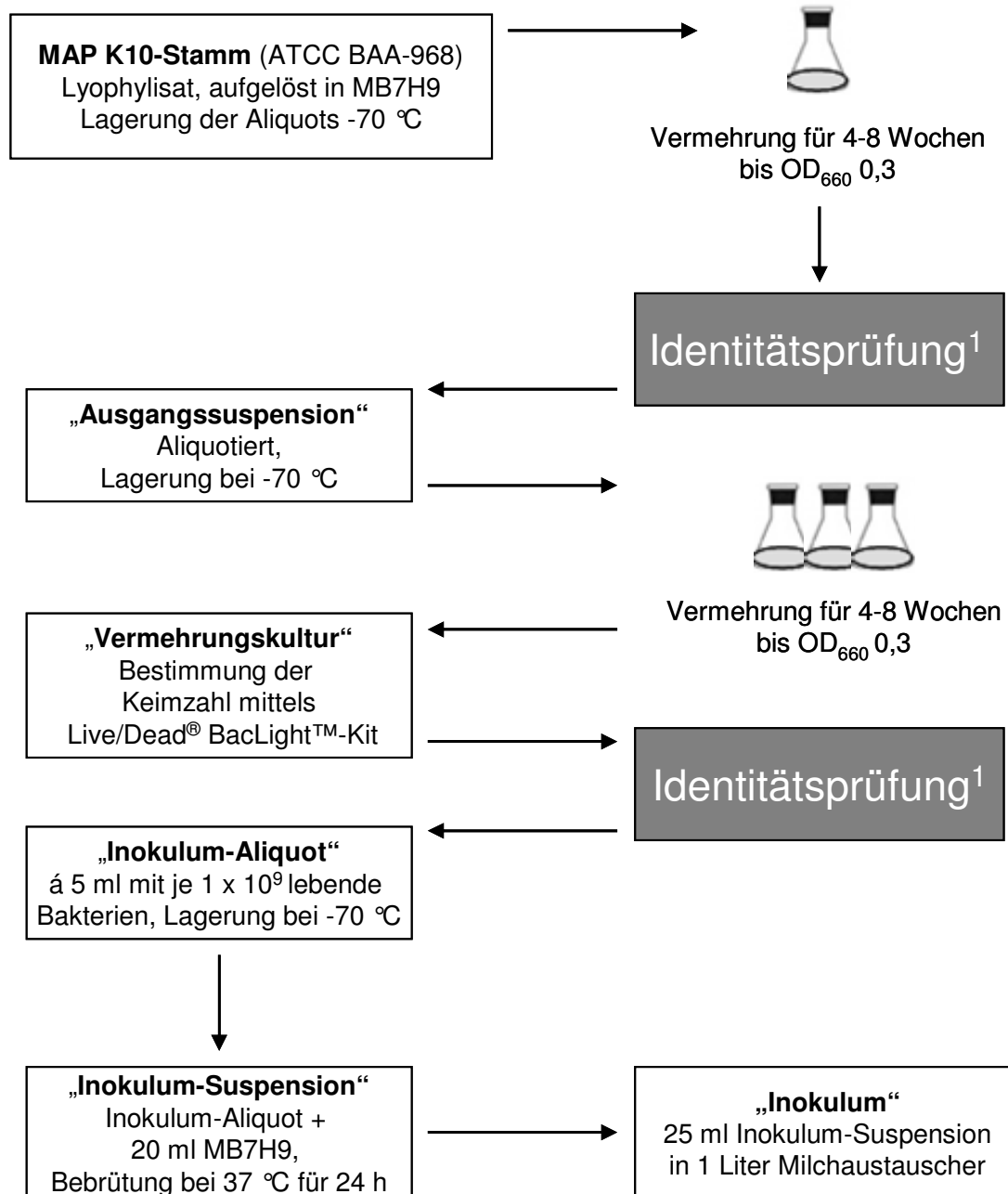


Abbildung 6: Schema zur Herstellung der MAP-haltigen Inokula für Kälber der Infektionsgruppe

¹ Ausstrich auf Blutagar, Ziehl-Neelsen-Färbung, PCR 251 nach Bannantine (2002), Real-Time Duplex PCR (F57 und ISMav2) nach Poupart (1993) und Strommenger (2001), Nested-PCR IS900 nach Bull (2003)

9 Serologische Methoden

9.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die 3 in dieser Studie verwendeten kommerziell erhältlichen ELISAs sind in **Tabelle 8** aufgeführt. Die Messung der optischen Dichten erfolgte mittels Plattenphotometer (Titertek Multiscan Ascent; Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim) bei 450 nm innerhalb von 5 min nach Zugabe einer Stopplösung. Bei jedem Waschvorgang wurden 300 µl Waschlösung pro Vertiefung pipettiert, danach wurde die Platte mit Schwung mehrmals auf einem Papierstapel ausgeklopft.

Tabelle 8: Übersicht über die 3 verwendeten kommerziell erhältlichen ELISAs

	Svanovir® Para-TB-Ab (Svanovir®-ELISA)	Pourquier® ELISA Paratuberculosis (Pourquier®-ELISA)	Cattletype® MAP Ab (Cattletype®-ELISA)
Antigen	LAM ¹	Antigene aus dem MAP- Protoplasma	MAP-Antigen ²
Serum- verdünnung	1:100	1:20	1:70
Präadsorptions- antigen	keines	MP	MP
Cut Off-Werte³			
negativer Befund	≤ 31 %	≤ 60 %	< 0,3
fraglicher Befund	≥ 32 % und < 53 %	> 60 % und < 70 %	≥ 0,3 und < 0,4
positiver Befund	≥ 53 %	≥ 70 %	≥ 0,4

Erläuterung:

- ¹ LAM: Lipoarabinomannan
- ² keine näheren Angaben erhältlich
- ³ angegeben als standardisierte Antikörpertiter berechnet nach den Vorgaben der Hersteller

9.1.1 Svanovir®-ELISA

Alle Serumproben, die im Svanovir®-ELISA getestet wurden, sowie die Positiv- und die Negativkontrolle wurden im Doppelansatz untersucht. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Test-Kit enthaltene Materialien und Reagenzien waren:

- mit Lipoarabinomannan (LAM)-Antigen beschichtete Mikrotiterplatten
- Anti-Rind-IgG-Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Konjugat (lyophilisiert)
- PBS-Tween-Waschlösung (20-fach konzentrierte Stammlösung)
- Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung
- Stopplösung (2 M H₂SO₄)
- positives und negatives Kontrollserum

Durchführung. Die Kontroll- und Testseren wurden 1:100 mit PBS-Tween-Lösung verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100 µl der vorverdünnten Serumproben und Kontrollseren in Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Inkubiert wurde für 30 min bei RT auf einem Schüttelinkubator (TITRAMAX® 100; Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) bei 900 rpm. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween-Lösung wurden 100 µl/Vertiefung des HRP-Konjugats hinzugefügt und anschließend für 30 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach 3 Waschzyklen wurde Substratlösung (100 µl/Vertiefung) dazu pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert, bevor die Reaktion mit Stopplösung (50 µl/Vertiefung) gestoppt wurde.

Validierung. Damit der Test als auswertbar galt, durften die OD₄₅₀-Werte der beiden Ansätze der Positivkontrollen nicht mehr als 25 % voneinander abweichen und die OD₄₅₀-Werte dieser Ansätze mussten größer als 1 sein. Die OD₄₅₀-Werte der Negativkontrollen mussten kleiner als 10 % des Mittelwertes der beiden Positivkontrollen sein.

Auswertung. Zur Bewertung der Serumproben wurde der Svanovir®-Titer nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Svanovir}^{\circledR}\text{-Titer } [\%] = \frac{OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Probe}}}{OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Positivkontrolle}}}$$

Proben mit einem Titer von ≥ 53 % wurden als positiv, Titer ≤ 31 % als negativ und Titer von 32 bis 52 % als fraglich beurteilt.

9.1.2 Pourquier®-ELISA

Alle Serumproben sowie die Negativkontrolle wurden im Einfachansatz getestet, die Positivkontrolle wurde im Doppelansatz untersucht. Durchführung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Test-Kit waren die folgenden Materialien und Reagenzien enthalten:

- mit Antigen aus dem MAP-Protoplasma beschichtete Mikrotiterplatten (nur die geradzahigen Spalten sind beschichtet)
- Anti-Rind-IgG-HRP-Konjugat
- je ein Verdünnungspuffer für die Seren und für das Konjugat
- Waschlösung (20-fach konzentrierte Stammlösung)
- Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung
- Stopplösung (0,5 M H₂SO₄)
- positives und negatives Kontrollserum

Durchführung. Die Test- und Kontrollseren wurden 1:20 mit dem MP-Extrakt verdünnt und unter Schütteln für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden jeweils 100 µl der vorverdünnten Serumproben und Kontrollseren in je eine beschichtete (geradzahige Spalte) und in eine unbeschichtete (ungeradzahige Spalte) Vertiefung pipettiert und für 45 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschzyklen wurde die 1:100 verdünnte Konjugatlösung (100 µl/Vertiefung) dazu pipettiert und die Platte für 30 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschzyklen wurde die Substratlösung in die Vertiefungen gefüllt (100 µl/Vertiefung). Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss für 10 min, danach wurde die Reaktion mit Stopplösung (100 µl/Vertiefung) abgestoppt.

Validierung. Für jede Serumprobe und jedes Kontrollserum wurde aus der Differenz der OD-Werte einer beschichteten und einer unbeschichteten Vertiefung der OD₄₅₀-Nettowert berechnet. Die Validierung erfolgte anhand des Mittelwertes der OD₄₅₀-Nettowerte der Positivkontrollen, welcher mindestens 0,350 betragen musste. Der Test war außerdem nur dann gültig, wenn außerdem das Verhältnis zwischen OD₄₅₀-Mittelwert der Positivkontrollen und OD₄₅₀-Nettowert der Negativkontrolle mindestens 3,5:1 betrug.

Auswertung. Für jede Probe wurde der Titer nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Pourquier}^{\circledR}\text{-Titer } [\%] = \frac{OD_{450}\text{-Nettowert}_{\text{Probe}}}{OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Positivkontrolle}}}$$

Proben mit einem Titer von ≤ 60 % galten als negativ, Titer von 60 bis 70 % als fraglich und Titer ≥ 70 % als positiv.

9.1.3 Cattletype®-ELISA

Serumproben und Kontrollseren wurden im Doppelansatz untersucht. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Test-Kit waren die folgenden Materialien und Reagenzien enthalten:

- mit MAP-Antigen beschichtete Mikrotiterplatten
- Kaninchen-Anti-Wiederkäuer-IgG-HRP-Konjugat
- Probenverdünnungspuffer für die Seren mit *M. phlei* (MP)-Extrakt
- Waschlösung (10-fach konzentrierte Stammlösung)
- TMB-Substratlösung
- Stopplösung (0,5 M H₂SO₄)
- ein positives und negatives Kontrollserum

Durchführung. Die Testseren wurden 1:70 mit dem MP-Extrakt vorverdünnt, die Kontrollseren wurden unverdünnt eingesetzt. Die mit dem MP-Extrakt versetzten Serumproben wurden für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden jeweils 100 µl der vorverdünnten Serumproben und Kontrollseren in je eine Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und für diese dann 30 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschzyklen wurde die 1:100 verdünnte Konjugatlösung (100 µl/Vertiefung) dazu pipettiert und die Mikrotiterplatte für 30 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschzyklen wurde 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung gefüllt. Die darauf folgende Substratinkubation erfolgte unter Lichtausschluss für 10 min. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung (100 µl/Vertiefung) abgestoppt.

Validierung. Die Validierung erfolgte anhand der OD₄₅₀-Werte der Positiv- und Negativkontrollen, wobei die Mittelwerte der Doppelansätze $\geq 0,7$ bzw. $\leq 0,2$ sein sollten.

Auswertung. Für jede Probe wurde der Titer nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Cattletype}^{\circledR}\text{-Titer} = \frac{OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Probe}} - OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Negativkontrolle}}}{OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Positivkontrolle}} - OD_{450}\text{-Mittelwert}_{\text{Negativkontrolle}}}$$

Titerwerte $< 0,3$ galten als negativ, Titer $\geq 0,3$ und $< 0,4$ als fraglich und Titer $\geq 0,4$ als positiv.

9.2 Durchflusszytometrische Antikörper-Tests (DFZM-Ak-Tests)

Im Rahmen der Etablierung der DFZM-Ak-Tests wurden die folgenden Variablen hinsichtlich ihres Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität der DFZM-Ak-Tests untersucht: die Konzentration der Seren und der Sekundärantikörper sowie die Konzentration der Präadsorptions- und Testantigene, die Wachstumsphase der MAP-Bakterien, die Methode der Titerberechnung und die Art des Präadsorptionsantigens. Des Weiteren wurden die Immunglobulinklassen IgG und IgM sowie die Subtypen IgG₁ und IgG₂ differenziert betrachtet. Anhand des verwendeten Sekundärantikörpers wurden Test 4 DFZM-Ak-Testvarianten definiert: DFZM-IgG-, DFZM-IgG₁-, DFZM-IgG₂- und DFZM-IgM-Test.

9.2.1 Etablierung und Optimierung der DFZM-Ak-Tests

Serumkonzentration. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration der zu untersuchenden Serumprobe wurden eine Serumprobe einer MAP-positiven Kuh (Pourquier[®]-positiv, positiver Direktnachweis von MAP im Kot) und eine Serumprobe einer Kuh aus dem MAP-unverdächtigen Betrieb 3 im Doppelansatz über 5 log₂-Stufen titriert (1:25 bis 1:400) und anschließend im DFZM-IgG-Test untersucht.

Sekundärantikörperkonzentration. Die FITC-markierten Sekundärantikörper wurden ebenfalls im Doppelansatz einer log₂-Titration unterzogen. Dabei wurden die FITC-markierten Sekundärantikörper über 4 log₂-Stufen von 1:50 bis 1:400 (IgG und IgG₁) bzw. von 1:25 bis 1:200 (IgG₂ und IgM) titriert.

MAP-Wachstumsphase. Um die Antigenität der MAP-Bakterien in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsphase zu untersuchen, wurden 3 MAP-Suspensionen in MB7H9-Medium über unterschiedlich lange Zeiträume kultiviert, bei unterschiedlichen OD₆₆₀-Werten geerntet (0,17; 0,31 und 0,98) und im DFZM-IgG-Test als Testantigen verwendet.

Konzentration der Präadsorptions- und Testantigene. Zuerst wurde die optimale Endkonzentration der Präadsorptionsantigene bestimmt. Dazu wurden anhand von Vorversuchen 3 Antigenkonzentrationen (OD₆₆₀ = 0,3, 0,6 und 0,9) ausgewählt und mit zwei Serumproben von MAP-positiven Kühen und mit einer Serumprobe einer MAP-negativen Kuh in den DFZM-Ak-Testvarianten untersucht. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration der Testantigene wurden, bei einer Konzentration von OD₆₆₀ = 0,6 der Präadsorptionsantigene, 3 Konzentrationen (OD₆₆₀ = 0,05, 0,1 und 0,4) ausgewählt und mit den oben genannten Serumproben in

den 3 DFZM-Ak-Testvarianten DFZM-IgG-, DFZM-IgG₁- und DFZM-IgG₂-Test analysiert.

Titerberechnung. Von insgesamt 40 Serumproben adulter Kühe wurde der MAP-spezifische Antikörpertiter mit 3 verschiedenen Berechnungsmethoden bestimmt. Die 3 verschiedenen Berechnungsmethoden der Titer sind dem **Kapitel III9.2.4** zu entnehmen.

Art des Präadsorptionsantigens. Die Serumproben von 40 adulten Kühen und die Serumproben der Kälber in der experimentellen Infektionsstudie wurden direkt ohne Präadsorption in den DFZM-Ak-Testvarianten eingesetzt oder vor deren Verwendung mit MP oder mit MAA präadsorbiert. Anschließend wurden die Sensitivität und die Spezifität der DFZM-Ak-Tests bei Verwendung der verschiedenen Präadsorptionsantigene miteinander verglichen.

9.2.2 Test- und Präadsorptionsantigene

Zur Bestimmung der optimalen Wachstumsphase der Bakterien und der optimalen Konzentration der Serumproben und der Sekundärantikörper wurden die Mykobakterien aus statischen Kulturen verwendet, die bei 37 °C bebrütet worden waren.

In allen Versuchen zur Evaluierung der DFZM-Ak-Tests sowie im Rahmen der experimentellen Infektionsstudie und der Feldstudien wurde eine einzige Charge von Mykobakterienantigenen verwendet (**Kapitel III8.3**). Vor Beginn eines Versuches wurden die bei -70 °C gelagerten Bakterien-Aliquots im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend bei 4.000 x g für 10 min bei RT abzentrifugiert (Tischzentrifuge Rotina 35, Fa. Hettich). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet mit Puffer A (PBS-Puffer mit 0,05 % Tween 80 und 10 % Superblock, pH 7,0) resuspendiert und auf eine OD₆₆₀ von 0,1 (Testantigene) bzw. auf eine OD₆₆₀ von 0,6 (Präadsorptionsantigene) eingestellt.

9.2.3 Durchführung der DFZM-Ak-Tests

Nach den Ergebnissen aus den Etablierungsversuchen wurden die DFZM-Ak-Tests schlussendlich nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Präadsorption. Die zu untersuchenden Serumproben wurden im Parallelansatz 1:50 in der MAA- oder MP-Bakteriensuspension verdünnt und für 60 min bei RT auf einem Schüttelinkubator (TITRAMAX® 100 Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co.KG) inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 10 min mit 16.000 x g bei RT zentrifugiert

(Tischzentrifuge Mikro 20, Fa. Hettich). Der Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und 100 µl davon unverdünnt in den DFZM-Ak-Tests eingesetzt.

Testantigen. Nach Einstellung der Testantigen-Suspensionen auf eine OD₆₆₀ von 0,1 wurden 100 µl dieser Suspension in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte mit V-Boden (Microwell, Fa. Greiner) pipettiert. Nach Zentrifugation mit 2.500 x g für 8 min bei 4 °C (Tischkühlzentrifuge 4K15C, Sigma Laborzentrifugen GmbH) wurde der Überstand verworfen und die Platte 2-3-mal vorsichtig auf Papiertüchern ausgeklopft.

Serumproben. Das Testpellet wurde anschließend mit 100 µl der zuvor 1:50 in Puffer A vorverdünnten Serumprobe oder der präadsorbierten Serumprobe resuspendiert. Danach wurden die Ansätze inkubiert (60 min bei RT). Daran anschließend erfolgten zwei Waschschrte, in denen mit 2.500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet schließlich mit 100 µl Puffer A pro Vertiefung resuspendiert wurde. Im Anschluss an die Waschschrte wurde erneut mit 2.500 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert.

Sekundärantikörper. Das hergestellte Bakterienpellet wurde anschließend mit 50 µl des in Puffer A vorverdünnten Sekundärantikörpers resuspendiert und für 60 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Gebrauchsverdünnung des Sekundärantikörpers bei der jeweiligen DFZM-Ak-Testvariante ist der **Tabelle 9** zu entnehmen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (2.500 x g; 10 min, 4 °C), wonach das Pellet mit 100 µl PBS-Puffer resuspendiert wurde. Diese Suspension wurde zusammen mit 200 µl PBS-Puffer in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 9: Übersicht über die in den DFZM-Ak-Testvarianten verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Firma	Bestellnr.	DFZM-Ak-Testvariante	Endkonzentration
Schaf-anti-Rind IgG, FITC-markiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI23F	DFZM-IgG-Test	1:200
Schaf-anti-Rind IgG ₁ , FITC-markiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI21F	DFZM-IgG ₁ -Test	1:200
Schaf-anti-Rind IgG ₂ , FITC-markiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI22F	DFZM-IgG ₂ -Test	1:100
Schaf-anti-Rind IgM, FITC-markiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI19F	DFZM-IgM-Test	1:100

9.2.4 Gating-Strategie und Auswertung der DFZM-Ak-Tests

Die Proben wurden im FACSCalibur™-Gerät gemessen. Insgesamt wurden bei jeder Messung 30.000 Partikel („Ereignisse“) gezählt. Zur Analyse wurde das geräte-spezifische Softwareprogramm „Cell Quest Pro“ und zur Auswertung der Daten das Programm FCS Express verwendet.

Im ersten Schritt wurden MAP- und MAA-Bakterien anhand ihrer Größe und Granularität durch die Seitwärtslichtstreuung und Vorwärtslichtstreuung dargestellt und in einem elektronischen Auswertfenster (R1) zusammengefasst (Zweiparameter-Dotplot-Darstellung) (**Abbildung 7**). Anschließend erfolgte die Darstellung der in R1 gemessenen Ereignisse in einem Histogramm. Die Anzahl der Ereignisse (Ordinate) wurde gegen die Fluoreszenzintensität (Abszisse) aufgetragen. Für jede gemessene Probe wurde die mittlere relative Fluoreszenzintensität (MFLI) der Partikel bestimmt, die aus den geometrischen Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten aller gemessenen Ereignisse einer Probe bestimmt wurde. Die MFLI-Werte wurden auf verschiedener Weise miteinander verrechnet.

Die MFLI der mit MAP-Antigen untersuchten Probe wurde wie folgt mit der MFLI der Positivkontrolle in Beziehung gesetzt:

$$DFZM-Titer-1 [\%] = \frac{MAP-MFLI_{Serumprobe}}{MAP-MFLI_{Positivkontrolle}} \times 100$$

Wenn eine Serumprobe sowohl mit dem MAP-Testantigen als auch mit dem MAA-Testantigen untersucht worden war, wurde der DFZM-Titer nach folgender Formel berechnet:

$$DFZM-Titer-2 [MFLI] = MAP-MFLI_{Serumprobe} - MAA-MFLI_{Serumprobe}$$

Zusätzlich wurde der DFZM-Titer-2 einer Serumprobe auf die Positivkontrolle wie folgt standardisiert:

$$DFZM-Titer-3 [\%] = \frac{MAP-MFLI_{Serumprobe} - MAA-MFLI_{Serumprobe}}{MAP-MFLI_{Positivkontrolle} - MAA-MFLI_{Positivkontrolle}} \times 100$$

Nachdem die Berechnung des DFZM-Titer-3 bei der Evaluierung des Tests an Kühen die besten Ergebnisse geliefert hatte, wurden die Titer in allen nachfolgenden Untersuchungen mit dieser Methode ermittelt.

Zur Festlegung von Cut Off-Werten wurden das 99 %ige und das 95 %ige Quantil der DFZM-Titer-3 der 6 Kontrolltiere in der experimentellen Infektionsstudie über den gesamten Beprobungszeitraum berechnet. Als fraglich wurden demnach

DFZM-Titer-3 mit Werten \geq das 95 %ige Quantil und $<$ das 99 %ige Quantil eingestuft, als positiv wurden DFZM-Titer-3 mit Werten \geq dem 99 %igen Quantil bewertet.

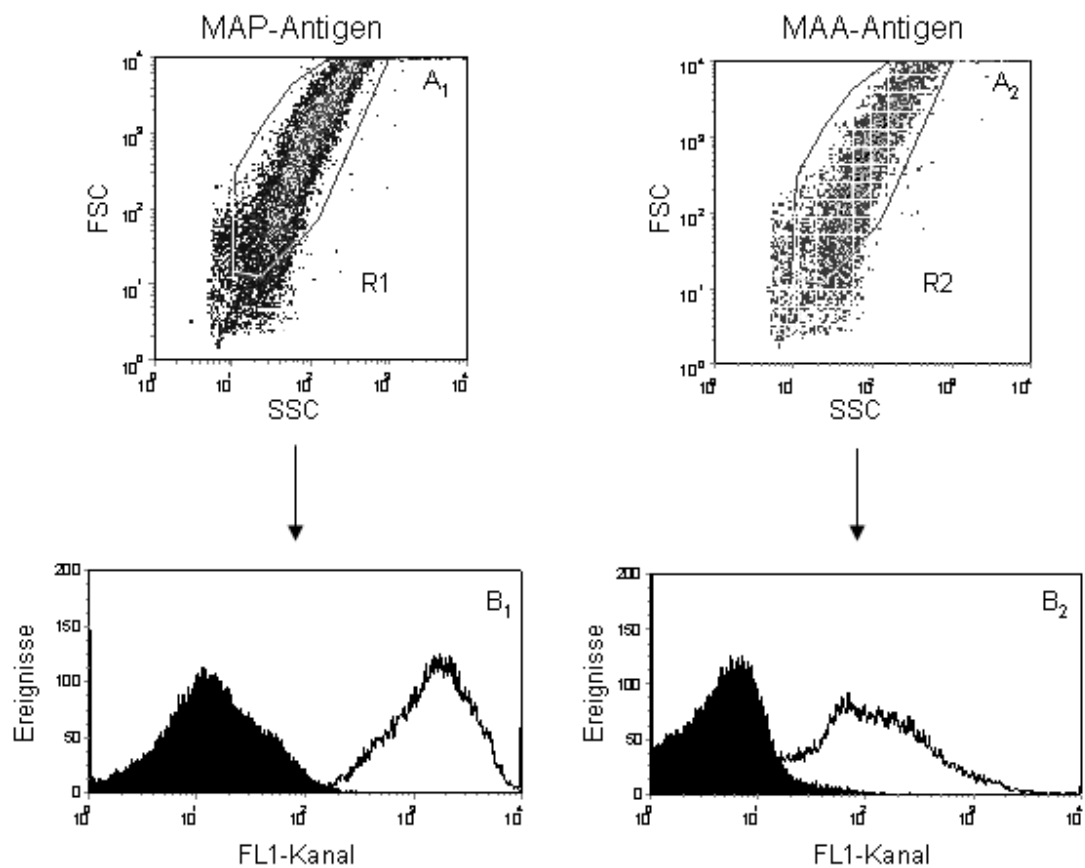


Abbildung 7: Gating-Strategie bei den DFZM-Ak-Tests (Beispiel)

[A₁₊₂]: MAP- und MAA-Bakterien im FSC-versus-SSC-Dotplot

[B₁₊₂]: Häufigkeitsverteilung der Testantigenpartikel in R1 bzw. in R2 nach ihrer Fluoreszenzintensität im FL1-Kanal:

schwarze Fläche: Testantigenpartikel nach Inkubation mit einer negativen Serumprobe
 weiße Fläche: Testantigenpartikel nach Inkubation einer positiven Serumprobe

10 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm „SPSS for Windows“ (Version 17.0, Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Zur Evaluierung der DFZM-Ak-Tests wurden Wertepaare für die Sensitivität und die Spezifität in Abhängigkeit vom Grenzwert für die jeweilige Testvariante mittels ROC (receiver operating characteristics)-Analyse bestimmt. Die diagnostische Leistungsfähigkeit eines Tests wurde dabei anhand der „area under the curve“ (AUC) bemessen. Die Skala von Swets (1988) diente der Beurteilung der dabei ermittelten AUC-Werte:

$AUC < 0,5$	Interpretationsregel ist ungeeignet
$AUC = 0,5$	Test ist nicht-informativ
$0,5 < AUC \leq 0,7$	Schwache Diskrimination
$0,7 < AUC \leq 0,9$	Mittelmäßige bis gute Diskrimination
$0,9 < AUC < 1$	Sehr gute Diskrimination
$AUC = 1$	Perfekte Diskrimination

IV Ergebnisse

1 Identifizierung von MAP-unverdächtigen Betrieben

Eine Voraussetzung für die Infektionsstudie war die Rekrutierung von neugeborenen Kälbern aus nachweislich MAP-unverdächtigen Betrieben. Zur Identifizierung solcher Rinderbetriebe wurde in Kooperation mit den Arbeitsgruppen der Klinik für Wiederkäuer und Schweine (KWS) und dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (IFTN) in Gießen ein dreistufiges Auswahlverfahren etabliert.

Dieses umfasste die Vorauswahl geeigneter Betriebe, eine blutserologische Untersuchung (Erst- und evtl. Wiederholungsuntersuchung) sowie eine kulturell-bakteriologische Untersuchung (Kotuntersuchung) aller weiblichen Rinder im Alter von über 24 Monaten. In insgesamt 8 vorberichtlich unverdächtigen Betrieben wurden alle weiblichen Rinder im Alter von über 24 Lebensmonaten serologisch im Svanovir®-ELISA untersucht. Rinder mit positivem oder fraglichem Testergebnis wurden im Pourquier®-ELISA nachuntersucht. Nur wenn die Svanovir®-positiven und -fraglichen Rinder im Pourquier®-negativ waren, wurde von allen Rindern über 24 Monaten eine Kotprobe entnommen und diese im IFTN kulturell-bakteriologisch und molekularbiologisch auf das Vorhandensein von MAP untersucht. Die Ergebnisse der Erstuntersuchung sind in **Abbildung 8** graphisch zusammengefasst. Leider waren in jedem Betrieb Kühe vorhanden, die im Svanovir®-ELISA positiv reagierten.

Der Anteil der Svanovir®-positiven und -fraglichen Rinder pro Betrieb schwankte zwischen 2,4 % und 24,5 % (Mittelwert 15,1 %; Median 16,7 %). Bei der Untersuchung der Svanovir®-positiven Rinder im Pourquier®-ELISA wiesen 2 der 8 Betriebe positive Reagenten auf und wurden folglich nicht weiter untersucht. Die Zahl der MAP-unverdächtigen Betriebe reduzierte sich auf 4 (Betriebe 1 bis 4), nachdem das IFTN in Gießen durch die kulturell-bakteriologische oder molekularbiologische Kotuntersuchung auch in 2 der 6 serologisch unverdächtigen Betriebe MAP-Ausscheider (n = 3) ermittelt hatte.

In der Zweituntersuchung (12 bis 18 Monate später) schwankte der Anteil der Svanovir®-positiven und -fraglichen Rinder in den 4 verbliebenen MAP-unverdächtigen Betrieben zwischen 6,8 % und 21,3 % (Mittelwert 13,8 %; Median 13,7 %) (**Abbildung 9A**). Im Gegensatz zu der Erstuntersuchung waren bei der Zweituntersuchung in einem der 4 MAP-unverdächtigen Betriebe (Betrieb 2) sowohl ein Pourquier®-fragliches

als auch ein Pourquoi®-positives Rind im Alter von über 24 Monaten identifizierbar. Mittels Anzuchtverfahren oder PCR war MAP allerdings bei keiner Kuh im Kot nachweisbar. Da der Inhaber von Betrieb 2 das seropositive und das -fragliche Rind sofort aus der Herde entfernte, nachdem ihm die Untersuchungsergebnisse mitgeteilt worden waren, blieb dieser Betrieb weiterhin als Reservebetrieb für die Lieferung von Kälbern für die experimentelle Infektionsstudie erhalten.

Von den Rindern, welche sowohl bei der Erst- und als auch bei der Zweituntersuchung serologisch untersucht wurden, wiesen bei der Erstuntersuchung 16 (10,7 %) ein Svanovir®-positives und 134 (89,3 %) Rinder ein Svanovir®-negatives Ergebnis auf (**Abbildung 9B**). In der Zweituntersuchung reagierten 4 der 16 Svanovir®-positiven Rinder aus der Erstuntersuchung negativ. Von den 134 Svanovir®-negativen Rindern aus der Erstuntersuchung wiesen 20 Rinder bei der Zweituntersuchung einen positiven Befund auf.

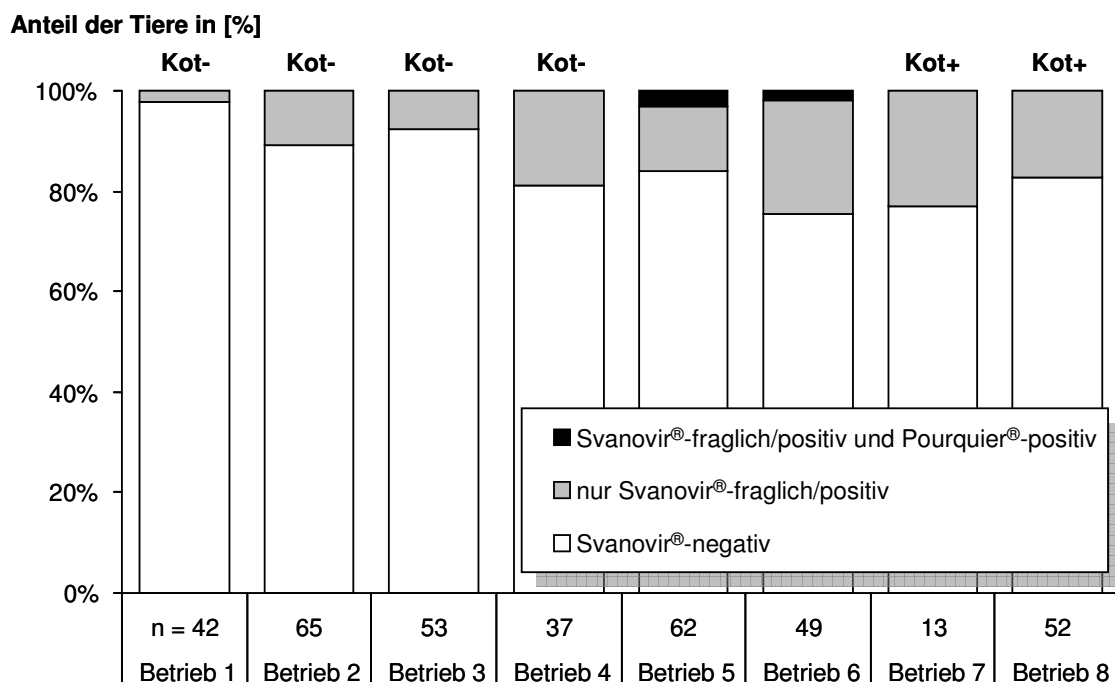


Abbildung 8: Anteil der im Svanovir®- bzw. Pourquoi®-ELISA positiven Reagenten unter den weiblichen Rindern im Alter von über 24 Lebensmonate in 8 vorbereitlich MAP-unverdächtigen Betrieben (Erstuntersuchung)

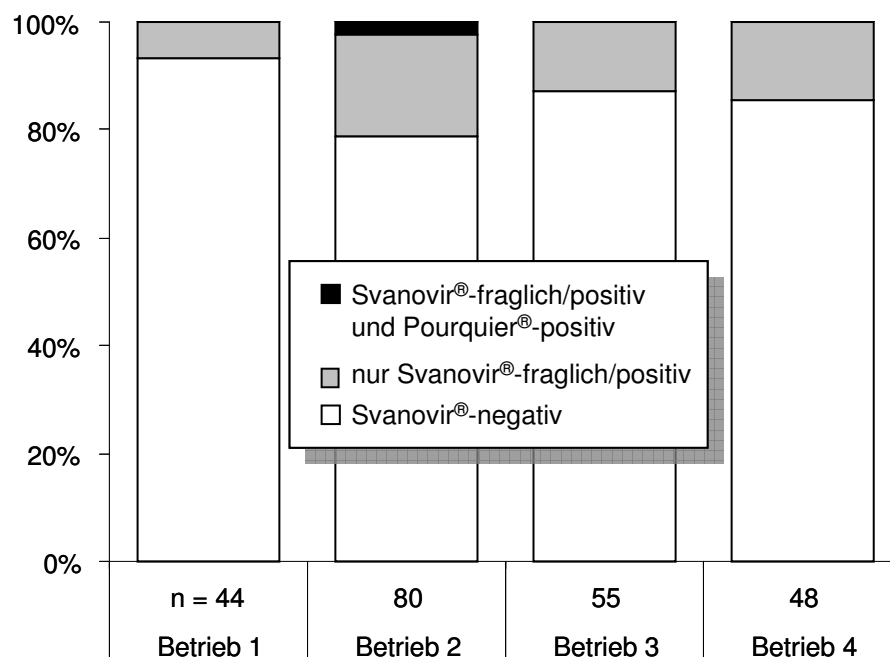
Kot+: MAP im Kot einiger Rinder nachweisbar

Kot-: MAP im Kot bei keinem der Rinder nachweisbar

n: Gesamtanzahl beprobter Rinder

Anzahl der Tiere in [%]

A



Anzahl der Tiere in [%]

B

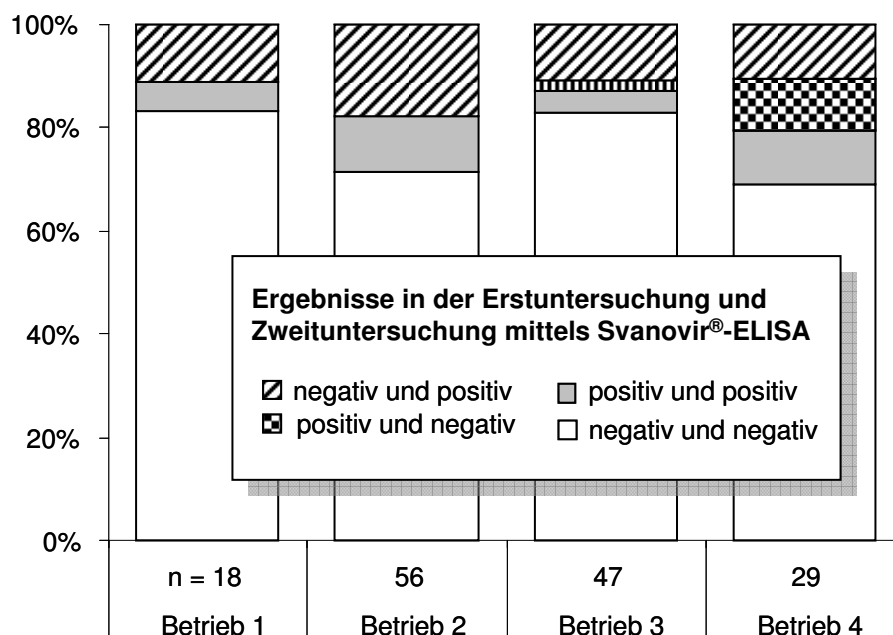


Abbildung 9: Anteil der im Svanovir®- bzw. Pourquier®-ELISA positiven Rinder in der Erst- und Zweituntersuchung

[A]: serologische Ergebnisse aus der Zweituntersuchung

[B]: Vergleich der Ergebnisse aus der Erst- und Zweituntersuchung von Rindern, die in beiden Untersuchungen beprobt wurden

n: Gesamtanzahl beprobter Rinder

2 Etablierung und Evaluierung der DFZM-Ak-Tests an adulten Rindern

Im Rahmen der Etablierung der DFZM-Ak-Tests wurden die folgenden Parameter optimiert: die Serum- und Sekundärantikörperkonzentration, die Wachstumsphase von MAP-Kulturen und die Konzentration der Präadsorptionsantigene. Für die Festlegung der Methode zur Titerberechnung und die Art des Präadsorptionsantigens sowie für den Vergleich der DFZM-Ak-Testvarianten untereinander und mit kommerziellen ELISAs wurden Serumproben von 22 MAP-negativen und 18 MAP-positiven Kühen verwendet.

2.1 Serum- und Sekundärantikörperkonzentrationen

Zur Bestimmung der optimalen Serumkonzentration wurden eine Serumprobe einer MAP-positiven Kuh (Pourquier[®]-positiv, positiver Direktnachweis von MAP im Kot) und eine Serumprobe einer Kuh aus dem MAP-unverdächtigen Betrieb 3 im Doppelansatz über 5 log₂-Stufen titriert und anschließend im DFZM-IgG-Test untersucht. Bei der gewählten Serumverdünnung 1:50 wiesen die MFLI-Werte der negativen und der positiven Serumprobe die größte Differenz auf (Daten nicht gezeigt). Diese Verdünnung entspricht der Verdünnung der Serumproben nach dem Protokoll von Eda *et al.* (2005).

Die FITC-markierten Sekundärantikörper wurden ebenfalls im Doppelansatz einer log₂-Titration unterzogen. Als optimal wurde die Verdünnung von 1:200 (IgG und IgG₁) bzw. 1:100 (IgG₂ und IgM) ermittelt, da die hiermit ermittelten Messwerte nahe des Wendepunktes der Titrationskurve lagen (Daten nicht gezeigt).

2.2 MAP-Wachstumsphase

Um die Antigenität der MAP-Bakterien in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsphase zu untersuchen, wurden 3 MAP-Suspensionen in MB7H9-Medium über unterschiedlich lange Zeiträume kultiviert. Die erste MAP-Suspension inkubierte für 9 Tage bei 37 °C und befand sich somit am Beginn der Log-Phase (OD₆₆₀: 0,17). Die zweite MAP-Suspension wurde nach 15-tägiger Inkubation in der mittleren Log-Phase bei einer OD₆₆₀ von 0,31 geerntet. Die dritte MAP-Suspension befand sich bereits in der stationären Phase (95-tägige Inkubation) und zeigte makroskopisch deutliche Klumpenbildung (OD₆₆₀: 0,98). Alle 3 MAP-Suspensionen wurden auf eine OD₆₆₀ von

0,3 eingestellt und anschließend im Parallelansatz mit Serum eines MAP-negativen und eines MAP-positiven Rindes inkubiert. Die Messung im Durchflusszytometer ergab, dass bei Verwendung der MAP-Suspension in der mittleren Log-Phase (OD_{660} : 0,31) die MAP-positive Serumprobe von der negativen Probe am besten abgrenzbar war (**Abbildung 10**).

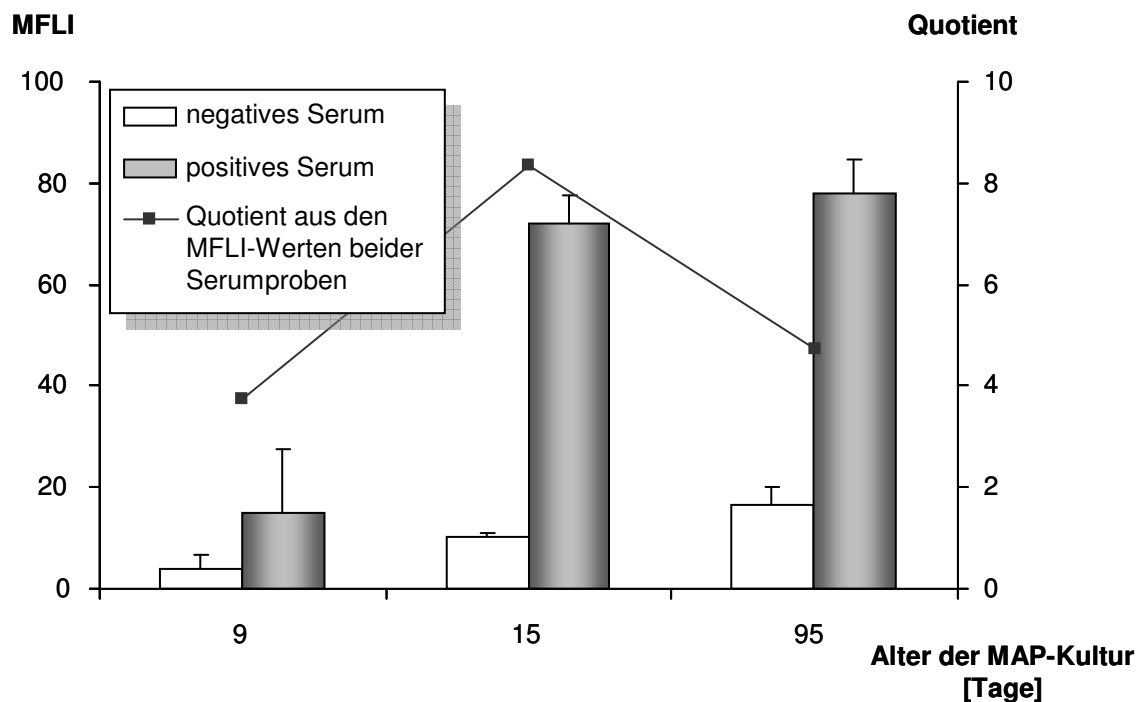


Abbildung 10: Nachweis der Antigenität von MAP-K10-Bakterien in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsphase

Im Doppelansatz wurden Serumproben eines MAP-negativen und eines MAP-positiven Rindes mit MAP-Bakterien aus 3 unterschiedlich lang inkubierten Kulturen (37 °C, MB7H9-Medium) getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren relativen Fluoreszenzintensität (MFLI) der Serumproben (ohne Präadsorption, IgG-Nachweis) sowie der aus den MFLI-Werten beider Proben berechnete Quotient (sekundäre y-Achse).

2.3 Konzentration der Präadsorptions- und Testantigene

Im nächsten Schritt wurden die verwendeten Endkonzentrationen der Präadsorptions- und Testantigene optimiert. Als optimale Endkonzentration der Präadsorptionsantigene MP und MAA kamen aufgrund der Ergebnisse in Vorversuchen 3 Antigenkonzentrationen (OD_{660} : 0,3, 0,6 und 0,9) in die engere Wahl. Zur Optimierung wurden wegen ihrer Titerwerte im Pourquier®-ELISA eine negative Serumprobe, eine niedrigtitrige positive Serumprobe (positives Serum 1) und eine hochtitrige positive Serumprobe (positives Serum 2) ausgewählt. Die eingesetzten Konzentrationen der Serumproben und der 3 Sekundärantikörper (IgG, IgG₁ und IgG₂) waren zuvor anhand von Titrationsversuchen festgesetzt worden und sind dem **Kapitel IV2.1** zu entnehmen. Die Endkonzentration der MAP- und MAA-Testantigene wurde auf eine OD_{660} von 0,1 eingestellt.

In der Tendenz wurden mit steigender Konzentration der Präadsorptionsantigene die ermittelten DFZM-Titer-2 sowohl beim IgG- als auch beim IgG₁- und beim IgG₂-Nachweis kleiner. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde der Quotient aus den Messwerten des positiven Serums 1 bzw. des positiven Serums 2 und der negativen Serumprobe gebildet (Pos1/Neg bzw. Pos2/Neg). Dabei erreichten die Quotienten Pos1/Neg und Pos2/Neg im DFZM-IgG-Test größere Werte in den Testansätzen mit einer MP-Konzentration von $OD_{660} = 0,6$ und $OD_{660} = 0,9$ als die Testansätze ohne Präadsorption oder Ansätze mit einer MP-Konzentration von $OD_{660} = 0,3$ (**Tabelle 10**). Im DFZM-IgG₁- bzw. DFZM-IgG₂-Test führte die Präadsorption mit MAA bzw. MP zu kleineren Quotienten als im Vergleich zu den Testansätzen ohne Präadsorption. Letztendlich wurde für beide Präadsorptionsantigene die $OD_{660} = 0,6$ als Gebrauchskonzentration in allen weiteren Untersuchungen gewählt.

Die Bestimmung der optimalen Konzentration der Testantigene fokussierte auf die 3 Konzentrationen $OD_{660} = 0,05$ sowie 0,1 und 0,4. In denjenigen Testansätzen, in denen die 3 Serumproben zuvor mit MAA- oder MP-Antigen präadsorbiert wurden, wurden diese Antigene in der Konzentration von $OD_{660} = 0,6$ eingesetzt. Die Quotienten Pos1/Neg und Pos2/Neg wiesen bei den Konzentrationen des Testantigens von $OD_{660} = 0,05$ und 0,1 meistens die größten Werte auf (**Tabelle 11**). Um die Durchführung des Tests zu vereinfachen, wurde für alle DFZM-Ak-Testvarianten die Endkonzentration der Testantigene von $OD_{660} = 0,1$ gewählt.

Tabelle 10: Bestimmung der optimalen Konzentration der Präadsorptionsantigene MAA und MP

Quotienten aus den DFZM-Titern-2 der positiven Serumprobe 1 (Pos1/Neg) bzw. der positiven Serumprobe 2 (Pos2/Neg) und der negativen Serumprobe in Abhängigkeit von der Konzentration der Präadsorptionsantigene MAA und MP, bei gleichbleibender Konzentration der MAP- und MAA-Testantigene ($OD_{660} = 0,1$).

Test-variante	Präad.-antigen	Quotient Pos1/Neg				Quotient Pos2/Neg			
		ohne Präad.	Konzentration des Präad.antigen ¹			ohne Präad.	Konzentration des Präad.antigen ¹		
			0,3	0,6	0,9		0,3	0,6	0,9
DFZM-IgG-Test	MAA	13,5	3,4	2,3	2,1	28,0	21,4	13,1	16,8
	MP	13,5	17,0	21,0	20,3	28,0	39,2	56,2	61,3
DFZM-IgG ₁ -Test	MAA	13,6	3,0	2,2	1,9	35,2	18,5	13,6	12,0
	MP	13,6	8,2	7,0	5,7	35,2	20,0	16,8	10,7
DFZM-IgG ₂ -Test	MAA	4,4	1,6	2,0	1,5	13,5	9,1	4,8	3,3
	MP	4,4	3,8	3,5	2,4	13,5	9,1	7,1	4,3

Erläuterungen:

¹ Schwarze Spalte: OD_{660} der entsprechenden Präadsorptionsantigen-Suspension

Pos1/Neg: OD_{660} der letztendlich ausgewählten Präadsorptionsantigen-Suspension

Pos2/Neg: Quotient aus den MFLI-Werten der positiven Serumprobe 1 und der negativen Serumprobe

Präad.: Quotient aus den MFLI-Werten der positiven Serumprobe 2 und der negativen Serumprobe

Präad.: Präadsorption

Tabelle 11: Bestimmung der optimalen Konzentration der Testantigene MAP und MAA

Quotienten aus den DFZM-Titern-2 der positiven Serumprobe 1 (Pos1/Neg) bzw. der positiven Serumprobe 2 (Pos2/Neg) und der negativen Serumprobe in Abhängigkeit von der Konzentration der Testantigene, bei gleichbleibender Konzentration der Präadsorptionsantigene (OD₆₆₀: 0,6).

Testvariante	Präad.-antigen	Pos1/Neg			Pos2/Neg		
		Konzentration der Testantigene ¹			Konzentration der Testantigene ¹		
		0,05	0,1	0,4	0,05	0,1	0,4
DFZM-IgG-Test	ohne	14,8	13,5	5,1	35,4	28,0	31,7
	MAA	2,0	2,3	2,3	9,2	13,1	16,7
	MP	8,6	21,0	17,6	33,0	56,2	54,0
DFZM-IgG ₁ -Test	ohne	17,1	13,6	1,8	30,6	35,2	17,3
	MAA	2,2	2,2	1,8	13,9	13,6	8,5
	MP	5,4	7,0	2,5	17,8	16,8	10,1
DFZM-IgG ₂ -Test	ohne	8,0	4,4	0,9	17,6	13,5	4,7
	MAA	2,4	2,0	1,4	5,3	4,8	2,7
	MP	3,0	3,7	1,2	3,5	7,1	4,7

Erläuterungen:

¹

Schwarze Spalte:

Pos1/Neg:

Pos2/Neg:

Präad.:

OD₆₆₀ der MAP- und MAA- Testantigen-SuspensionenOD₆₆₀ der letztendlich ausgewählten Testantigen-Suspension

Quotient aus den MFLI-Werten der positiven Serumprobe 1 und der negativen Serumprobe

Quotient aus den MFLI-Werten der positiven Serumprobe 2 und der negativen Serumprobe

Präadsorption

2.4 Titerberechnung

Um die optimale Methode der Titerberechnung zu bestimmen wurden Serumproben von MAP-negativen ($n = 22$) und MAP-positiven ($n = 18$; bakteriologische Kotuntersuchung Kultur- und/oder PCR-positiv) weiblichen Rindern im Alter von über 24 Monaten verwendet. Alle 40 Serumproben wurden in den 3 DFZM-Ak-Testvarianten DFZM-IgG-, DFZM-IgG₁- und DFZM-IgG₂-Test untersucht. Dabei wurden verschiedene Methoden der Titerberechnung (DFZM-Titer-1, -2 und -3) sowie verschiedene Präadsorptionsbedingungen jeweils vergleichend hinsichtlich ihres Einflusses auf die Eigenschaft der DFZM-Ak-Tests untersucht, zwischen den MAP-positiven und den MAP-negativen Rindern serologisch unterscheiden zu können. Die Unterscheidungskraft der Test- und Auswertungsvarianten wurden mittels ROC-Analysen ermittelt.

Die höchsten Werte für Sensitivität (83 %) und Spezifität (100 %) wurden im DFZM-IgG₁-Test (MP-Präadsorption) mit dem DFZM-Titer-2 erreicht (**Abbildung 11**). Einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf ergab die Verwendung des DFZM-Titers-3. Bei dieser Titerberechnung wies der DFZM-IgG₁-Test bei einer Spezifität von gerade 100 % eine Sensitivität von 78 % auf. Mit der Verwendung des DFZM-Titers-1 erreichte man bei gerade 100 %iger Spezifität eine deutlich niedrigere Sensitivität von nur 61 %. Im DFZM-IgG₁-Test erreichten bei Betrachtung der AUC (area under the curve) die DFZM-Titer-2 und -3 mit 0,94 die höchsten Werte und wiesen damit eine sehr gute Diskrimination auf.

Im DFZM-IgG-Test wurde bei Berechnung des DFZM-Titer-2 und des DFZM-Titer-3 mit einer AUC von 0,93 bzw. 0,92 ebenfalls eine sehr gute Diskrimination erreicht. Im DFZM-IgG₂-Test wiesen dagegen alle 3 Methoden der Titerberechnung nur eine mittelmäßige bis gute Diskrimination auf, wenn man die AUC-Werte zugrunde legt.

Letztendlich wurde in allen weiteren Untersuchungen die Berechnung des DFZM-Titers-3 dem DFZM-Titer-2 vorgezogen, da zwischen diesen Titerberechnungen beim Nachweis von IgG₁ und IgG₂ nur ein geringer bzw. kein Unterschied hinsichtlich der Sensitivität bestand und eine Standardisierung auf die mitgeführte Positivkontrolle sinnvoll erschien.

2.5 Art des Präadsorptionsantigens

Zur Beurteilung der Präadsorptionsbedingungen wurde nur der DFZM-Titer-3 verwendet (**Abbildung 12**). Die Präadsorption mit MP oder MAA erhöhte die Sensitivität des DFZM-IgG₁-Tests in der Testpopulation von 55,6 % (ohne Präadsorption) auf 77,8 % bzw. 61,1 % bei gerade 100 %iger Spezifität. Bei einer 94,4 %igen Sensitivität wurde durch die MP-Präadsorption die Spezifität von 72,7 % (ohne Präadsorption) auf 86,4 % erhöht. Die MAA-Präadsorption war bei einer Sensitivität von 88,9 % mit 95,5% spezifischer als der Ansatz ohne Präadsorption (86,4 % Spezifität). Im DFZM-IgG-Test wurde die Sensitivität von 38,9 % (ohne Präadsorption) bei gerade 100 %iger Spezifität nur durch die MP-Präadsorption (44,4 %) erhöht. Die Spezifität von 86,4 % (ohne Präadsorption) erhöhte sich durch die MP- oder MAA-Präadsorption auf 95,5 %.

Bei Betrachtung der AUC erreichte die MP-Präadsorption in allen 3 DFZM-Ak-Testvarianten mit 0,93 (IgG-Nachweis), 0,94 (IgG₁-Nachweis) und 0,77 (IgG₂-Nachweis) die höchsten Werte. Daher wurde für alle weiteren Versuche die MP-Präadsorption der MAA-Präadsorption vorgezogen.

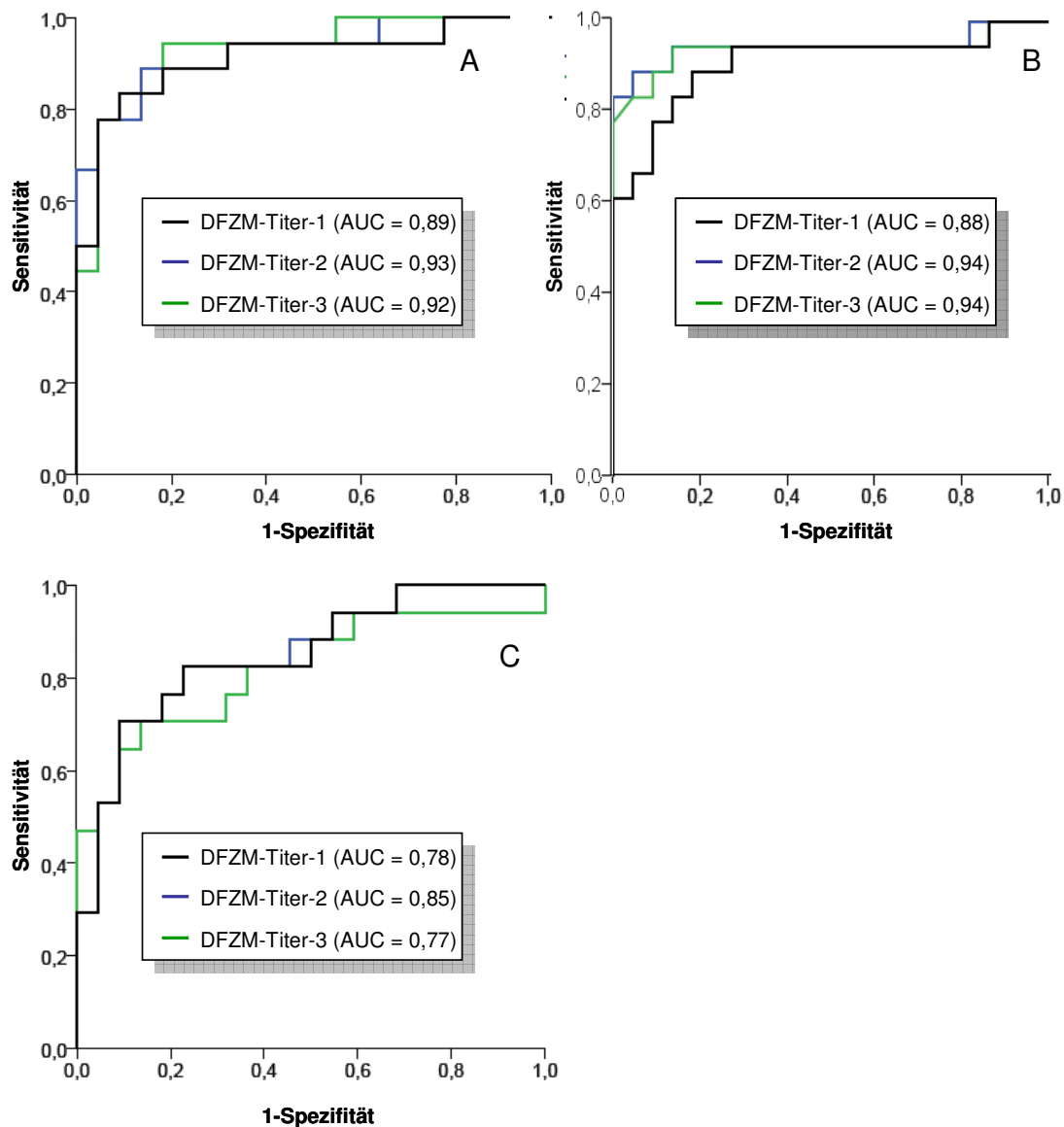


Abbildung 11: Vergleich von 3 verschiedenen Methoden zur Titerberechnung in den DFZM-Ak-Testvarianten (ROC-Analyse)

Der Analyse liegen die Testergebnisse für Serumproben von 22 MAP-negativen und 18 MAP-positiven Kühen zugrunde.

[A]: DFZM-IgG-Test, MP-Präadsorption

[B]: DFZM-IgG₁-Test, MP-Präadsorption

[C]: DFZM-IgG₂-Test, MP-Präadsorption

AUC: area under the curve

ROC: receiver operating characteristic

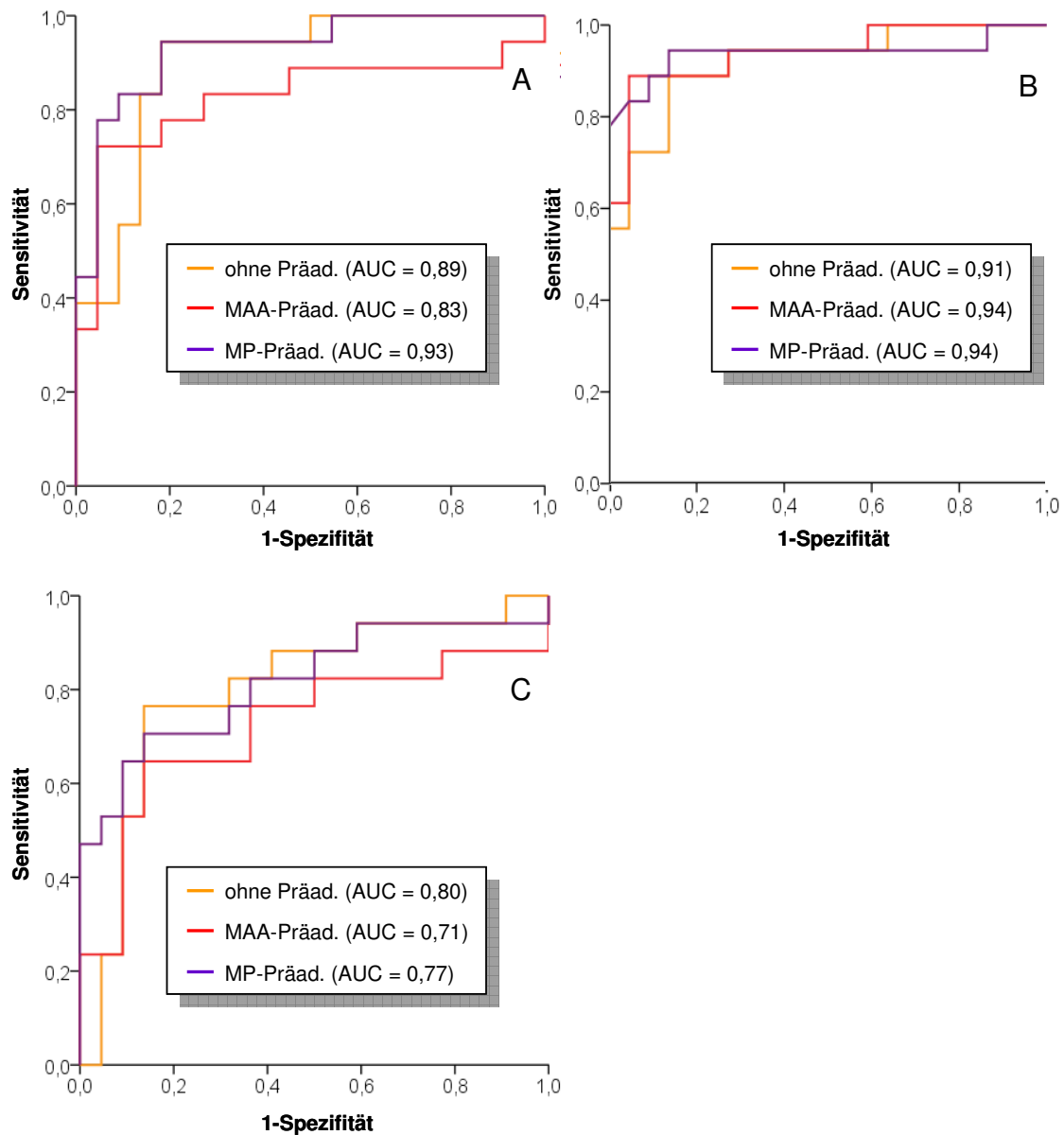


Abbildung 12: Vergleich von 3 Methoden zur Präadsorption der Serumproben in den DFZM-Ak-Testvarianten (ROC-Analyse)

Der Analyse liegen die Testergebnisse für Serumproben von 22 MAP-negativen und 18 MAP-positiven Kühen zugrunde.

[A]: DFZM-IgG-Test, DFZM-Titer-3

[B]: DFZM-IgG₁-Test, DFZM-Titer-3

[C]: DFZM-IgG₂-Test, DFZM-Titer-3

AUC: area under the curve

ROC: receiver operating characteristic

2.6 Vergleichende Untersuchung der Testqualität von DFZM-Ak-Testvarianten und kommerziellen ELISAs

Zur Evaluierung der DFZM-Ak-Tests und zum Vergleich der Testvarianten mit kommerziellen ELISAs wurden ebenfalls die Serumproben von MAP-negativen ($n = 22$) und MAP-positiven ($n = 18$; bakteriologische Kotuntersuchung Kultur- und/oder PCR - positiv) weiblichen Rindern im Alter von über 24 Monate verwendet. Die 22 MAP-negativen Serumproben waren zuvor sowohl im Pourquier[®]- als auch im Svanovir[®]-ELISA mit der Ausnahme eines fraglichen Ergebnisses im Svanovir[®]-ELISA, negativ getestet worden. Von den MAP-positiven Rindern hatten im Pourquier[®]-ELISA (Pq) 11 Rinder ein positives („MAP-Kot+/Pq+“) und 7 Rinder ein negatives Resultat („MAP-Kot+/Pq-“) erzielt.

Betrachtet man die Ergebnisse der Kotuntersuchung auf MAP als Goldstandard, so wies von den DFZM-Ak-Testvarianten der DFZM-IgG₁-Test (MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3) bei gerade 100 %iger Spezifität die höchste Sensitivität von 77,8 % auf (**Abbildung 13**). Bei einer Spezifität $\leq 90,9$ % verlief die ROC-Kurve des IgG-Nachweises nahezu identisch mit der ROC-Kurve des IgG₁-Nachweises. Der Nachweis von MAP-spezifischem IgG₂ war in der Testpopulation bei gerade 100 %iger Spezifität nur zu 44,4 % sensitiv. Dementsprechend erzielten der DFZM-IgG- (AUC 0,93) und der DFZM-IgG₁-Test (AUC 0,94) eine sehr gute Diskrimination, wohingegen der DFZM-IgG₂-Test (AUC 0,77) nur mittelmäßig diskriminativ war.

Die 3 kommerziellen ELISAs wiesen bei einer Spezifität von 100 % eine Sensitivität von 61 % (Cattletype[®]-ELISA), 72 % (Pourquier[®]-ELISAs) bzw. 38,9 % (Svanovir[®]-ELISA) auf (**Abbildung 14**). Bei Verwendung der vom Hersteller angegebenen Cut Off-Werte sank die Sensitivität auf 61,1 % (Pourquier[®]-ELISAs) bzw. 27,8 % (Cattletype[®]-ELISA und Svanovir[®]-ELISA).

Im DFZM-IgG₁-Test reagierten die Serumproben von allen negativen Rindern negativ und diejenigen von MAP-Kot+/Pq+ Rindern in 10 von 11 Fällen positiv (**Tabelle 12**). Der DFZM-IgG₁-Test erkannte außerdem auch 4 der 7 MAP-Kot+/Pq- Rinder als positiv. Mit dem Cattletype[®]- und dem Svanovir[®]-ELISA konnten nur 5 bzw. 2 MAP-Kot+/Pq+ Rinder als positiv erkannt werden. Aus der Gruppe der MAP-Kot+/Pq- Rindern erkannte nur der Svanovir[®]-ELISA eines von 7 Rindern als positiv.

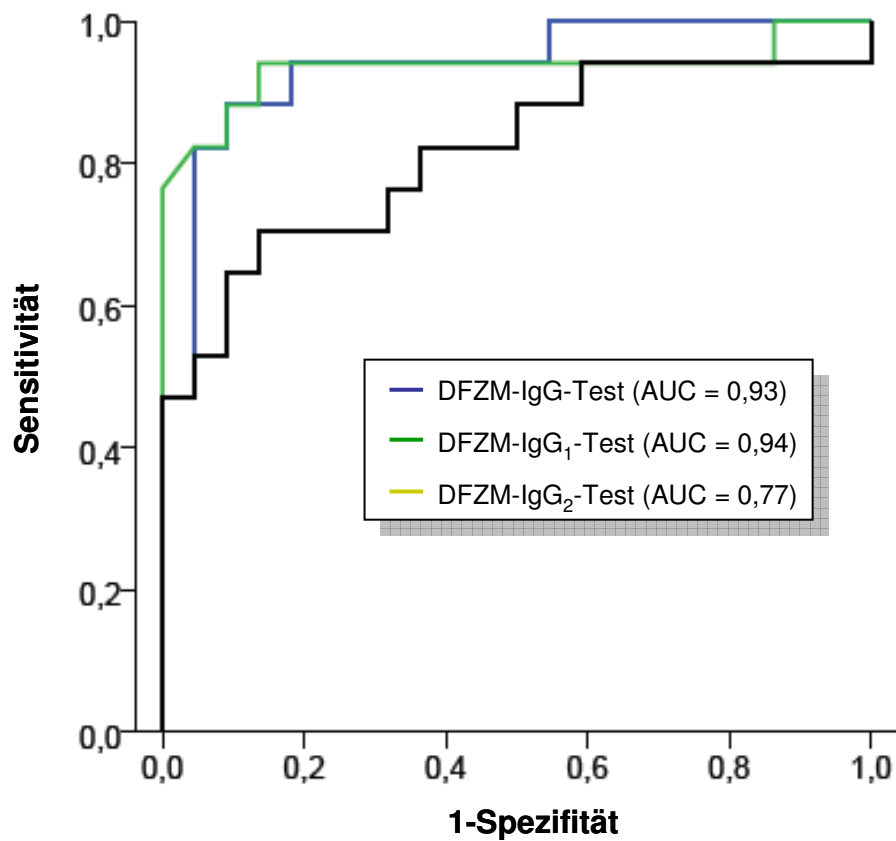


Abbildung 13: Vergleich der Sensitivität und Spezifität der 3 DFZM-Ak-Testvarianten (MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3) mittels ROC-Analyse

Der Analyse liegen die Testergebnisse für Serumproben von 22 MAP-negativen und 18 MAP-positiven Kühen zugrunde.

AUC: area under the curve

ROC: receiver operating characteristic

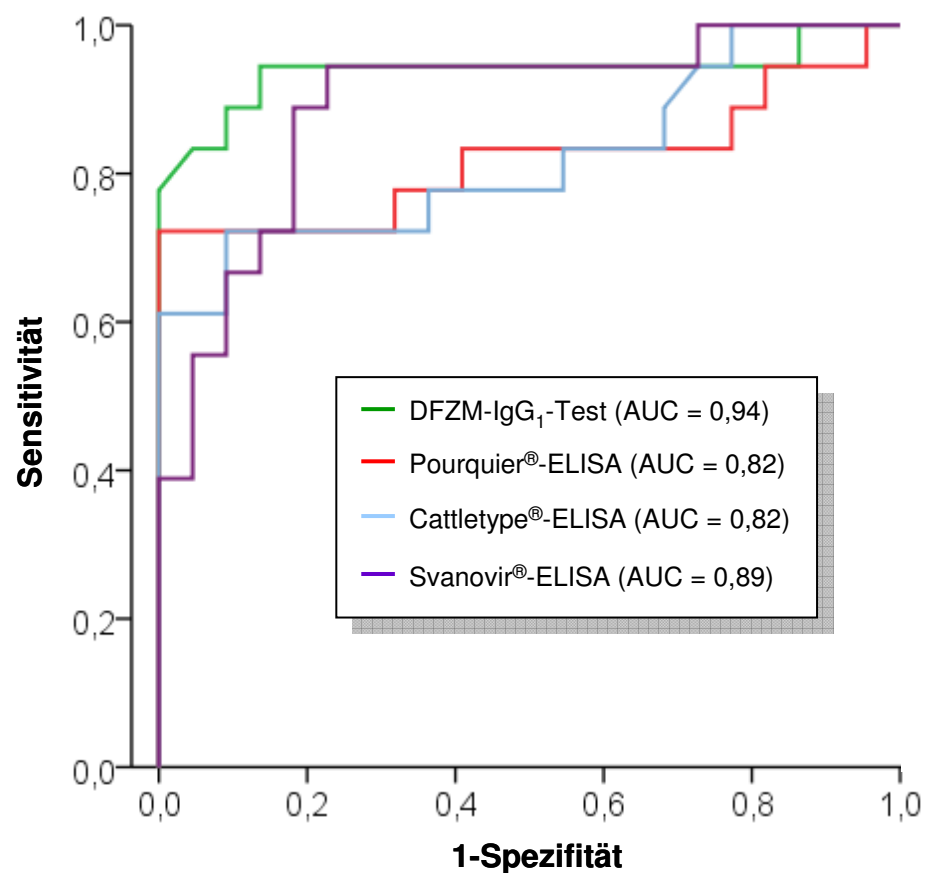


Abbildung 14: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des DFZM-IgG₁-Tests (MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3) mit 3 kommerziellen ELISAs mittels ROC-Analyse

Der Analyse liegen die Testergebnisse für Serumproben von 22 MAP-negativen und 18 MAP-positiven Kühen zugrunde.

AUC: area under the curve

ROC: receiver operating characteristic

Tabelle 12: Nachweis der MAP-Infektion bei Kühen mittels Svanovir[®]-, Cattletype[®]-ELISA und DFZM-IgG₁-Test im Vergleich zur kulturell-bakteriologischen Untersuchung (Goldstandard-Test)

Tabellarische Übersicht der richtigen Zuteilung der Serumproben in die 3 Gruppen: MAP-negative, MAP-Kot+/Pq+ und MAP-Kot+/Pq- Rinder. Bei den ELISAs wurde der vom Hersteller angegebene Cut Off-Wert, beim DFZM- IgG₁-Test der Cut Off-Wert für eine 100 %ige Spezifität verwendet.

	Anzahl und Anteil der zutreffend erkannten Kühe		
	MAP-negativ n = 22	MAP-positiv (Kot+/Pq+) n = 11	MAP-positiv (Kot+/Pq-) n = 7
Svanovir[®]-ELISA	22 (100 %)	2 (18,2 %)	1 (14,29 %)
Cattletype[®]-ELISA	22 (100 %)	5 (45,5 %)	0 (0 %)
DFZM-IgG-Test	22 (100 %)	8 (72,7 %)	0 (0 %)
DFZM-IgG₁-Test	22 (100 %)	10 (90,9 %)	4 (57,1 %)
DFZM-IgG₂-Test	22 (100 %)	6 (54,6 %)	2 (28,6 %)

Erläuterungen: n: Anzahl der untersuchten Serumproben
Pq: Pourquier[®]-ELISA

3 Etablierung des LIVE/DEAD® BacLight™-Kits

Bei der Infektionsstudie mussten alle Kälber mit der gleichen definierten MAP-Keimzahl inokuliert werden. Deshalb war es unbedingt notwendig, dass eine zuverlässige und möglichst rasch durchzuführende Keimzählmethode eingesetzt wurde. Die Wahl fiel auf das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (LIVE/DEAD® BacLight™-Kit, Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe). In eigenen Versuchsreihen wurde das Kit auf seine Eignung zur MAP-Keimzählung geprüft.

3.1 Gating-Strategie bei der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse

Zunächst wurden die ausgewählte Gating-Strategie (Bestimmung der Auswertfenster) und das Färbeverhalten der MAP-Bakterienzellen anhand von MAP-Keimsuspensionen überprüft. Zum Vergleich wurde eine Suspension von *E. coli* C600, für die Gating-Strategie bereits vom Hersteller beschrieben worden war, nach Herstelleranleitung gefärbt. In **Abbildung 16** ist das mikroskopische Bild der MAP-Suspension im Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

Die *E. coli*-Population war im Vergleich zur MAP-Population im FSC (engl.: forward scatter) versus SSC (engl.: side scatter)-Diagramm deutlicher von unspezifischen Partikeln abgrenzbar und wies zudem eine geringere Streuung der Größe innerhalb der Population auf (**Abbildung 15**). Dennoch konnte die MAP-Population in einem elektronischen Auswertfenster (Gate) eingefasst werden.

Die Übernachtskultur von *E. coli* C600 wies mit 99,5 % einen hohen Anteil lebender *E. coli*-Bakterien auf. In der MAP-Suspension betrug dieser Anteil 72,1 % (**Tabelle 13**). Der Anteil unspezifischer Messpartikel lag bei den mitgeführten Kontrollansätzen unter 2 %.

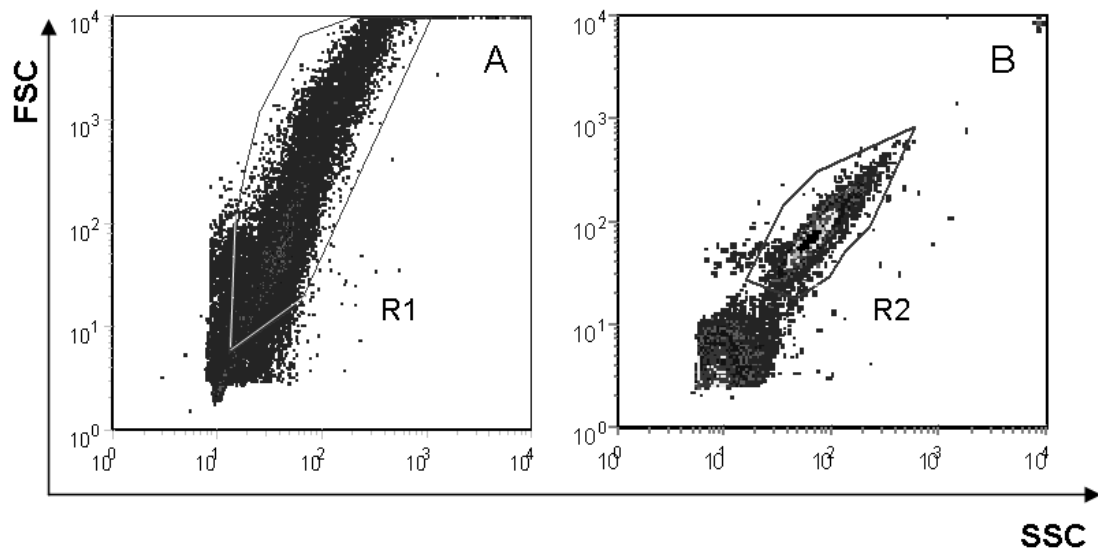


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse von MAP- und *E. coli*-Bakterienzellen

Vergleich der Zellmorphologie von

[A]: MAP in R1 und

[B]: *E. coli* in R2 im FSC-versus-SSC-Diagramm

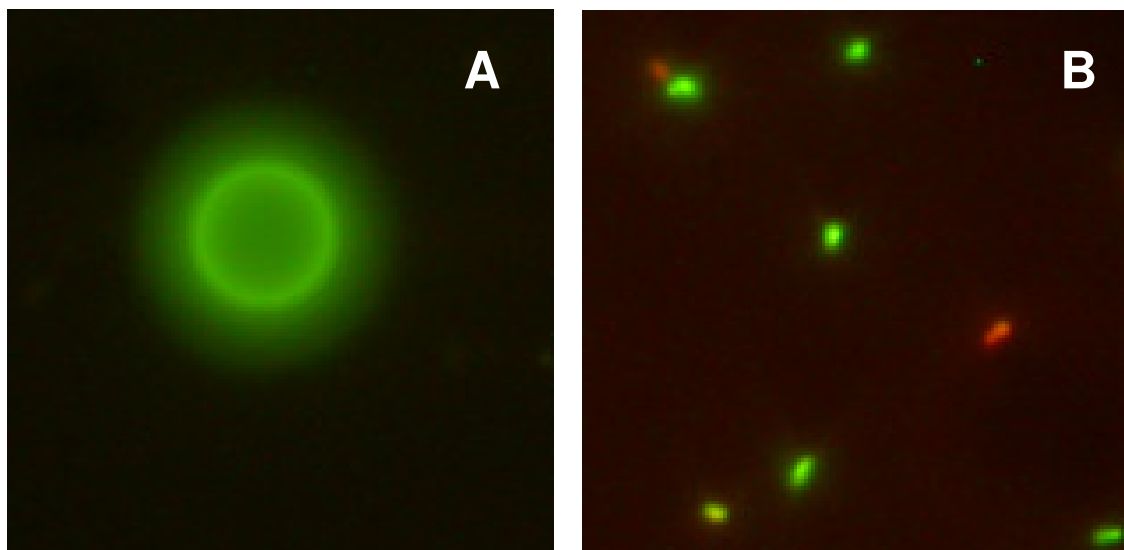


Abbildung 16: Darstellung einer nach dem Protokoll des LIVE/DEAD® BacLight™-Kit gefärbten MAP-Suspension im Fluoreszenzmikroskop

Ausschnitt einer Originalaufnahme bei 1.000-facher Vergrößerung und Verwendung eines Rot-Grün Filters (Exzitationsfilter: 490 nm ± 10 und 575 nm ± 15).

[A]: Darstellung eines Beads

[B]: Darstellung von „lebenden“ (grün) und „toten“ (rot) MAP-Bakterien

Tabelle 13: Ergebnis der durchflusszytometrischen Lebendkeimzahl-Bestimmung in Bakteriensuspensionen mittels LIVE/DEAD® BacLight™-Kit

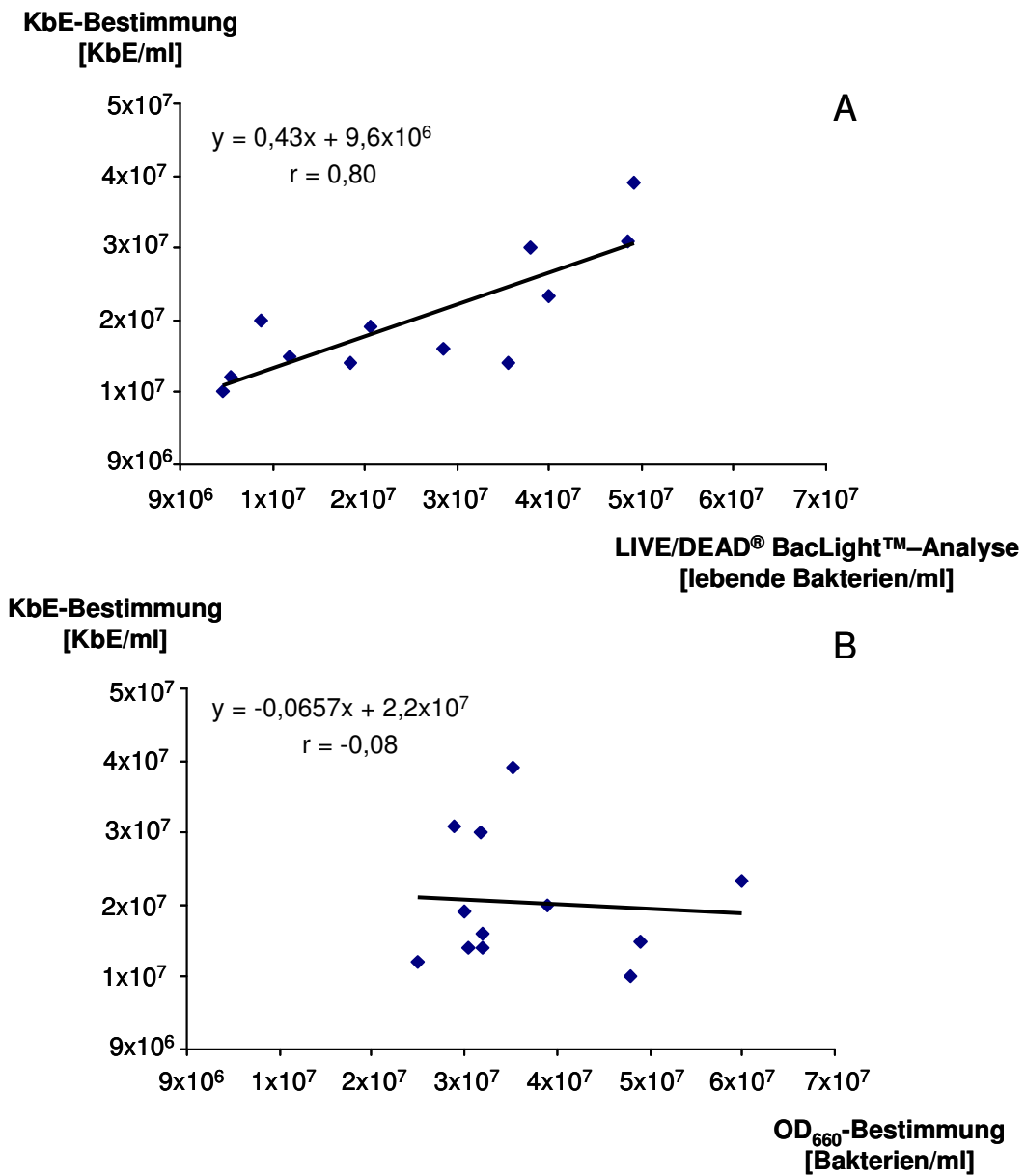
Art des Ansatzes	Wesentliche Komponenten des Ansatzes	Anteil der Bakterien an der Bakteriensuspension [%]			
		MAP K10 ¹		<i>E. coli</i> C600 ²	
		„lebende“	„tote“	„lebende“	„tote“
Testansatz	+ Bakterien + Farbstoff	72,1	27,9	99,5	0,5
Kontrollansatz 1	+ Bakterien - Farbstoff	1,6	0,3	< 0,1	< 0,1
Kontrollansatz 2	- Bakterien + Farbstoff	0,6	0,9	0,2	< 0,1
Kontrollansatz 3	- Bakterien - Farbstoff	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Erläuterungen: Die Keimzahl der mit dem Kit zu prüfenden Suspension betrug
¹ 2,6 x 10⁷ Bakterien/ml
² 4,6 x 10⁹ Bakterien/ml

3.2 Korrelation der verschiedenen Keimzählmethoden

Die KbE-Bestimmung mittels Oberflächenverfahren (Harris und Barletta, 2001) stellt die Goldstandardmethode zur Bestimmung der Anzahl „lebender“ Bakterien in einer MAP-Suspension dar. Um eine Aussage über die Korrelation zwischen den verschiedenen Keimzählmethoden treffen zu können, wurde die Lebendkeimzahl von 12 verschiedenen MAP-Bouillonkulturen parallel mit der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse, der Messung der optischen Dichte bei 660 nm (OD₆₆₀) und der Goldstandardmethode bestimmt.

Eine gute Korrelation ergab sich für die mittels LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse bestimmte Konzentration an „lebenden“ Bakterien und der mittels Oberflächenverfahren ermittelten Konzentration an KbE ($r = 0,80$). Zwischen den Ergebnissen der KbE-Bestimmung und der OD-Messung ($r = -0,08$) sowie zwischen den Resultaten der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse und der OD-Messung ($r = 0,10$) bestand kein Korrelation (**Abbildung 17**).



Fortsetzung der **Abbildung 17** auf der nächsten Seite

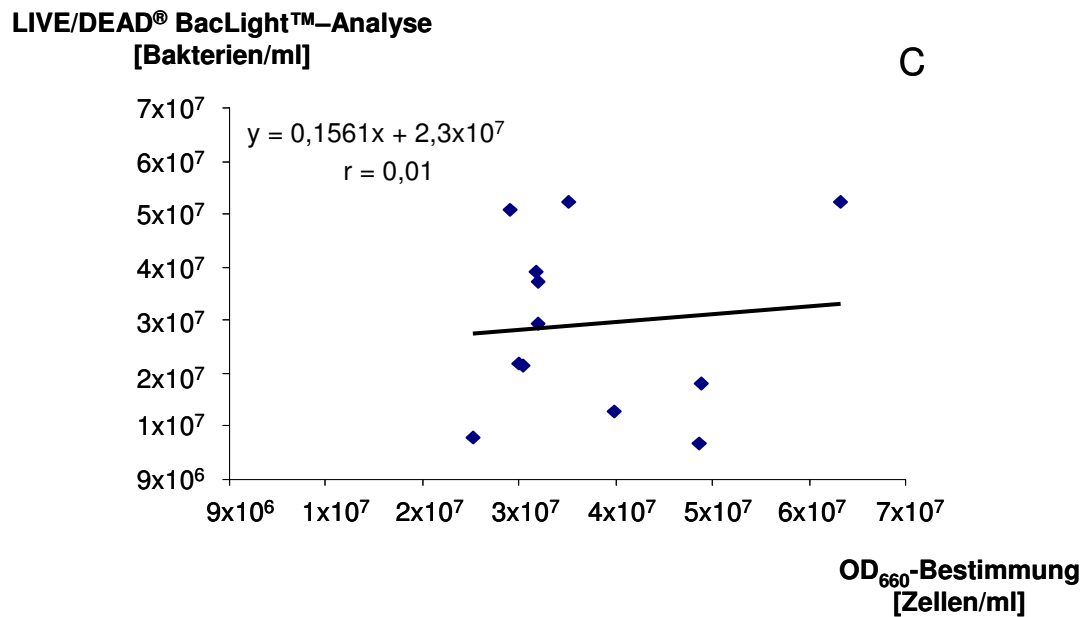


Abbildung 17: Korrelationen zwischen den mittels LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse und den mittels OD₆₆₀-Messung sowie Oberflächenverfahren in MAP-Suspensionen (n = 12) ermittelten Keimzahlen

- [A]: Korrelation der KbE-Bestimmung mit der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse
 [B]: Korrelation der KbE-Bestimmung mit der OD₆₆₀-Messung
 [C]: Korrelation der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse mit der OD₆₆₀-Messung

n: Anzahl der MAP-Kulturen

4 Ergebnisse der experimentellen Infektionsstudie

Die DFZM-Ak-Tests wurden an insgesamt 14 Kälbern aus 4 MAP-unverdächtigen Betrieben evaluiert. Sieben Kälber bildeten die Kontrollgruppe, die anderen 7 Kälber wurden experimentell mit MAP infiziert (Infektionsgruppe). Die Inokulation mit MAP erfolgte dreimal im Abstand von je 2 Tagen am 10., 12. und 14. Lebenstag. Die Kontrolltiere erhielten Scheininokula. Allen Kälbern wurden zu den jeweils gleichen definierten Zeitpunkten Darmlymphknotenbiopate, Kot-, Vollblut- und Serumproben entnommen. Die „Nullprobe“ (Kot-, Vollblut- und Serumprobe) wurde einen Tag vor der ersten Inokulation (9. Lebenstag) gewonnen. Serumproben für den MAP-spezifischen Antikörpernachweis (Pourquier®-ELISA, DFZM-Ak-Tests) wurden danach im 14-tägigen Rhythmus entnommen.

Für den Vergleich der Kontrollgruppe mit der Infektionsgruppe wurden die Daten nach dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurden die Werte zur Berechnung der Signifikanzen logarithmisch transformiert. Das Kalb 11 schied vorzeitig aus den Untersuchungen aus (siehe unten), weshalb bei der Infektionsgruppe die Ergebnisse von nur 5 Kälbern bis zur 50. Woche *post infectionem* (W.p.i.) in den Gruppenvergleich berücksichtigt wurden. Bei der Kontrollgruppe flossen bis zur 50. W.p.i. wie geplant die Ergebnisse von 6 Kälbern in die Auswertung ein. In der 52. W.p.i. war bereits ein Kalb aus jeweils einer Gruppe euthanasiert worden. Diese zwei fehlenden Werte wurden durch einen Zeitreihen-Mittelwert ersetzt. Vor Anwendung des t-Tests wurde eine zweifaktorielle (Faktoren Gruppe und Zeit) Varianzanalyse mit Messwiederholungen durchgeführt. In die Berechnung wurden nur die Werte der Kontrollkälber und MAP-infizierten Kälber ab der 20. W.p.i. miteinbezogen, da erst ab diesem Zeitpunkt nicht mehr mit maternalen Antikörpern zu rechnen war (siehe **Kapitel 5.1**). Für die DFZM-Ak-Testvarianten, bei denen eine signifikante Wechselbeziehung zwischen den Faktoren Gruppe und Zeit bestand, wurde die Signifikanz des Gruppenunterschiedes mit Hilfe des einseitigen t-Tests nach Student für unabhängige Stichproben ermittelt.

4.1 Ergebnis der Inokulationsdosis-Überprüfung

Aufgrund der Lagerung der Inokulum-Aliquots über 100 Tage bei -70 °C war eine Abnahme der ursprünglich auf 1×10^9 „lebende“ Bakterien pro Inokulum-Aliquot eingestellten Keimkonzentration zu befürchten. Um die an die Kälber tatsächlich verabreichte Inokulationsdosis zu bestimmen, wurde die Keimkonzentration der

Inokulumsuspension unmittelbar vor Verabreichung an die Kälber stichprobenartig ($n = 8$) mittels LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse und KbE-Bestimmung ermittelt. Der Mittelwert aus den 8 Messungen betrug für die KbE-Bestimmung $3,5 \times 10^8$ KbE/Dosis (25 ml) und für die LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse $1,5 \times 10^8$ lebende Bakterien/Dosis (**Tabelle 14**). Gemessen an den Resultaten des Obeflächenverfahrens erhielt jedes Kalb bei den 3 Inokulationen á 25 ml durchschnittlich eine Gesamtdosis von $1,05 \times 10^9$ KbE.

Tabelle 14: Bestimmung der an die Kälber verabreichten MAP-Keimzahlen

Zur Berechnung der durchschnittlich an die Kälber verabreichten Bakterienzahl pro Inokulation (Einzeldosis) wurde der Mittelwert aus 8 Inokulumsuspensionen ermittelt. Die Gesamtdosis der Bakterienzahl pro Kalb berechnete sich aus den Mittelwerten der 3 Einzeldosen.

	KbE-Bestimmung [KbE/ml]	LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse [lebende Bakt./ml]
mittlere Einzeldosis (25 ml)	$3,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
Maximum	$6,0 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
Minimum	$2,3 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$
Standardabweichung	$1,4 \times 10^8$	$0,9 \times 10^8$
mittlere Gesamtdosis je Kalb (3 x 25ml = 75 ml)	$10,5 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$

4.2 MAP-Status der Muttertiere

Um den negativen MAP-Status der für die Infektionsversuche vorgesehenen Kälber sicher zu stellen, wurden die Muttertiere der Kälber 4 bis 7 Tage nach der Geburt sowohl serologisch (Blut und Milch) als auch kulturell-bakteriologisch und molekularbiologisch (Kot) auf MAP-Antikörper bzw. auf MAP untersucht. Der Direkt-nachweis von MAP im Kot war bei allen Tieren negativ (persönliche Mitteilung von Marta Fischer, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde). Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen sind in der **Tabelle 15** aufgeführt. Außer Mutter 5 (fraglicher Svanovir®-Titer) und Mutter 10 (fraglicher DFZM-Titer-3 im DFZM-IgG-Test) fiel das Ergebnis der serologischen Tests für alle Muttertiere negativ aus.

Tabelle 15: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der Muttertiere

Bezeichnung	Herkunft	Svanovir®- Titer [%]	Pourquier®- Titer [%]	DFZM-Titer-3 ¹ IgG [%]	IgG ₁ [%]
<u>Kontrollgruppe</u>					
Mutter 1	Betrieb 3	10,6	2,5	-8,7	-10,5
Mutter 3	Betrieb 2	8,3	0,5	-4,7	5,6
Mutter 4	Betrieb 2	7,7	1,2	4,9	7,7
Mutter 5	Betrieb 3	46,9	11,7	-7,1	2,2
Mutter 6	Betrieb 3	9,5	2,8	-3,2	7,9
Mutter 7	Betrieb 1	9,0	-0,9	-8,7	-10,5
<u>Infektionsgruppe</u>					
Mutter 8	Betrieb 1	7,8	3,4	5,3	7,9
Mutter 10	Betrieb 4	8,3	2,6	15,0	2,4
Mutter 11	Betrieb 4	8,5	12,1	13,1	18,0
Mutter 12	Betrieb 2	19,2	13,3	-0,3	13,9
Mutter 13	Betrieb 2	n.b.	1,2	-1,7	9,0
Mutter 14	Betrieb 2	n.b.	-0,3	5,3	11,0

Erläuterungen:

¹ nach Präadsorption der Serumproben mit MP
n.b.: nicht bestimmt

Cut Off-Werte zwischen dem negativen und fraglichen bzw.
zwischen dem fraglichen und positiven Bereich:

Svanovir®-ELISA: 32 % bzw. 53 %

Pourquier®-ELISA: 60 % bzw. 70 %

DFZM-IgG-Test: 14,8 % bzw. 17,8 %

DFZM-IgG₁-Test: 22,2 % bzw. 34,3 %

4.3 Ergebnis der klinischen Überwachung der Kälber

Im Versuchszeitraum waren bei folgenden Kälbern klinische Auffälligkeiten zu beobachten (persönliche Mitteilungen von Dr. T. Seeger und Prof. Dr. K. Doll, Klinik für Wiederkäuer und Schweine, JLU Gießen):

Kalb 2 wurde aufgrund eines Mangelzustandes bei der Einstellung Vitamin E und Selen verabreicht. Dieses Tier wurde nach Feststellung einer Aufgasung des Magen-Darmtraktes am 6. Lebenstag mit Antibiotika und Rehydratationslösung behandelt. Die Aufgasung trat aber auch danach rezidivierend auf. Am 46. Lebenstag (5. W.p.i.) wurde Kalb 2 aufgrund einer erneuten hochgradigen Aufgasung als Notfall operiert. Mit dem Befund eines paralytischen Ileus wurde das Kalb während des Eingriffes euthanasiert.

Bei Kalb 3 wurde am 281. Lebenstag (38. W.p.i.) ein mechanischer Ileus diagnostiziert, welcher durch eine Notoperation erfolgreich behoben werden konnte. Dieses Kalb blieb nach der Operation eine Woche in Einzelhaltung.

Kalb 5 wurde am 29. Lebenstag (2. W.p.i.) aufgrund einer Rotavirusinfektion über 3 Tage oral mit Rehydratationslösung behandelt.

Kalb 6 erhielt am 16. Lebenstag (0. W.p.i.) aufgrund eines geringgradigen Eisenmangels eine Eiseninjektion. Des Weiteren wurde am 81., 83. und 84. Lebenstag (10. W.p.i.) eine linksseitige Labmagenverlagerung festgestellt, welche durch konservative Therapie behoben werden konnte.

Bei den Kälbern 8, 13 und 14 wurde eine durch Kryptosporidien bedingte Diarrhoe diagnostiziert. Die Kälber wurden mit oraler Rehydratationslösung behandelt [Kalb 8 (6.-16. Lebenstag), Kalb 13 (6.-16. Lebenstag) und Kalb 14 (10.-16. Lebenstag)]. Aufgrund einer Otitis media wurde bei den Kälbern 8 und 9 ab dem 6. Lebenstag bzw. ab dem 39. Lebenstag über 5 Tage Penicillin verabreicht.

Kalb 9 wurde frühzeitig aus der Studie ausgeschlossen, da MAP bei der kulturell-bakteriologischen Untersuchung einer Kotprobe vom 9. Lebenstag nachgewiesen wurde.

Kalb 11 wurde am 253. Lebenstag (34. W.p.i.) nach einer Notoperation euthanasiert. Der Sektionsbefund ergab eine akute hämorrhagische Enteritis sowie eine mittelgradige Spitzenlappenpneumonie.

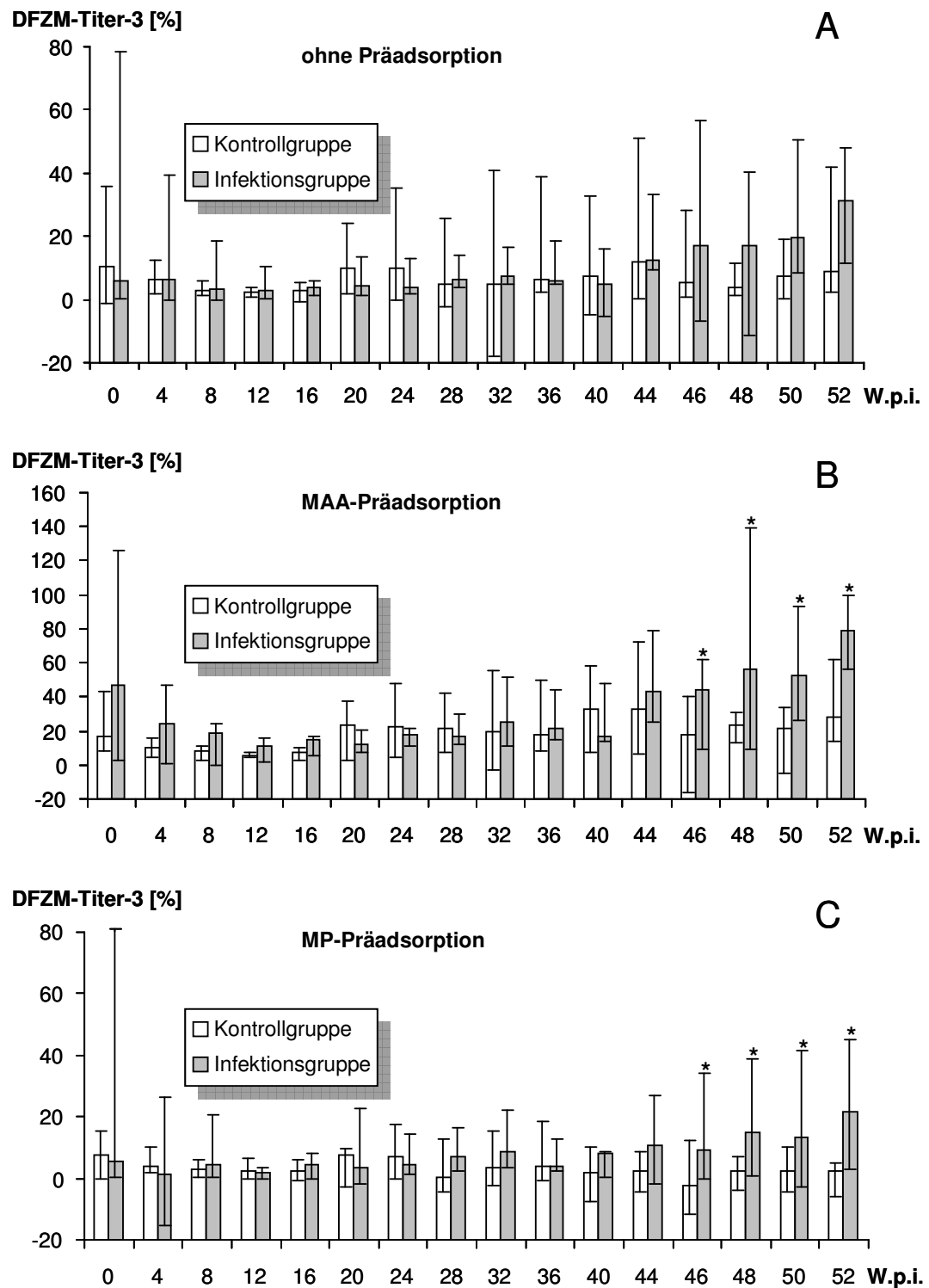
4.4 Dynamik MAP-spezifischer Antikörper in der Kontroll- und in der Infektionsgruppe

Ähnlich wie bei den erwachsenen Rindern wurde auch an den Kälbern der Einfluss der Präadsorption (MAA- oder MP-Antigen oder keine Präadsorption) auf die Qualität der DFZM-Ak-Testvarianten untersucht. Als Qualitätsparameter diente hierbei der einseitige t-Test nach Student für unabhängige Stichproben, anhand dessen die Signifikanz des Gruppenunterschiedes zwischen der Kontrollgruppe und der Infektionsgruppe je Untersuchungszeitpunkt ermittelt wurde. Auf einen erneuten Vergleich der verschiedenen Methoden zur Titerberechnung wurde aufgrund der Ergebnisse in **Kapitel IV2.4** verzichtet und einheitlich nur der DFZM-Titer-3 bestimmt.

Im DFZM-IgG-Test zeigte sich bei Anwendung der MP-Präadsorption von der 46. bis zur 52. W.p.i. ein signifikanter Mittelwertunterschied zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe (**Abbildung 18, Tabelle 17**). Auch bei Präadsorption der Serumproben mit MAA waren die Mittelwerte ab der 46. W.p.i. zwischen den Gruppen signifikant verschieden. Im DFZM-IgG₁-Test konnte bei Anwendung der MAA-Präadsorption ab der 40. W.p.i. (exklusiv 50. W.p.i.) und mit der MP-Präadsorption ab der 44. W.p.i. (exklusiv 46. W.p.i.) ein signifikanter Mittelwertunterschied nachgewiesen werden. Wurden die Serumproben im DFZM-IgG- als auch im DFZM-IgG₁-Test ohne Präadsorption getestet, konnte anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse kein signifikanter Einfluss der Faktoren Gruppe und Zeit auf die DFZM-Titer-3 beobachtet werden (**Tabelle 16**).

Im DFZM-IgG₂- und DFZM-IgM-Test war für keine Testvariante ein signifikanter Einfluss der Faktoren Gruppe und Zeit auf die DFZM-Titer-3 festzustellen, weshalb die Prüfung des Gruppenunterschieds auf Signifikanz an dieser Stelle entfiel. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde nur noch die MP-Präadsorption verwendet, da die Messdaten bei der Berechnung des DFZM-Titers-3 bereits auf MAA normalisiert wurden.

Beim Vergleich der 4 DFZM-Ak-Testvarianten (DFZM-Titer-3, MP-Präadsorption) zeigte sich ein signifikanter Mittelwertunterschied zwischen der Kontroll- und Infektionsgruppe nur bei der Untersuchung auf MAP-spezifisches IgG (ab der 46. W.p.i.) und IgG₁ (44., 48., 50., 52. W.p.i.) (**Abbildung 18C und 18F; Abbildung 19**). Sowohl beim IgG₂- (Mittelwert 13,9, STABW 14,8) als auch beim IgM-Nachweis (Mittelwert -12,4, STABW 27,1) wiesen die Titerwerte der Kontrollgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum insgesamt eine hohe Streuung auf. Dagegen streuten die Titer in der Kontrollgruppe beim IgG-Nachweis (Mittelwert 3,4, STABW 5,2) und im IgG₁-Nachweis (Mittelwert 6,5, STABW 6,5) weniger.



Fortsetzung der **Abbildung 18** auf der nächsten Seite

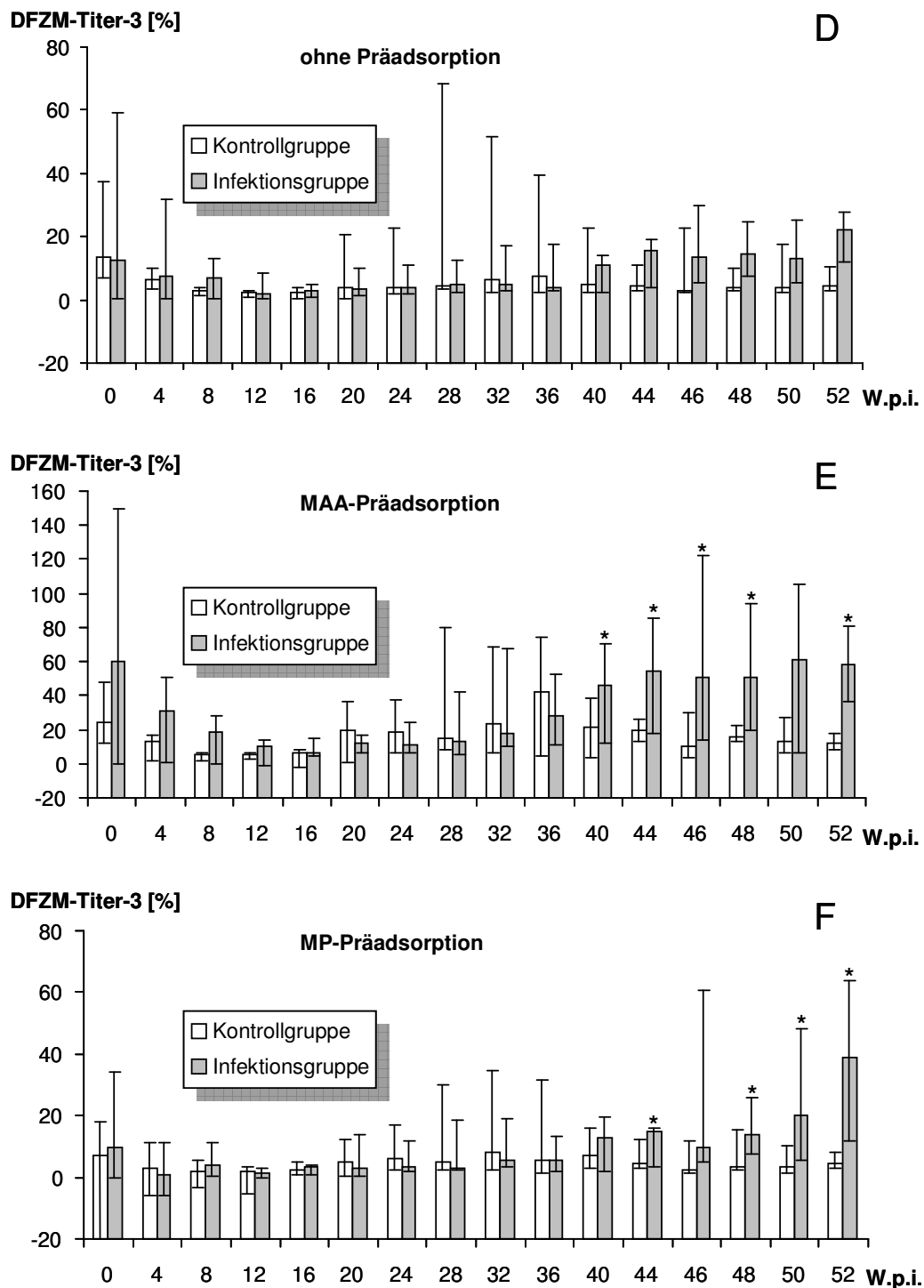


Abbildung 18: DFZM-Titer-3 bei den Kälbern der Infektions- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Präadsorption der Serumproben

Die Titerverteilung in der jeweiligen Gruppe ($n = 5$ bzw. $n = 6$) ist für jeden Messzeitpunkt als Median (Säule), Minimum und Maximum (Linien) dargestellt. Die statistische Analyse wurde anhand der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten Titer vorgenommen.

DFZM-IgG-Test

[A]: ohne Präadsorption

[B]: MAA-Präadsorption

[C]: MP-Präadsorption

* signifikanter Mittelwertunterschied ($p \leq 0,05$; t-Test nach Student)

W.p.i.: Wochen *post infectionem*

DFZM-IgG₁-Test

[D]: ohne Präadsorption

[E]: MAA-Präadsorption

[F]: MP-Präadsorption

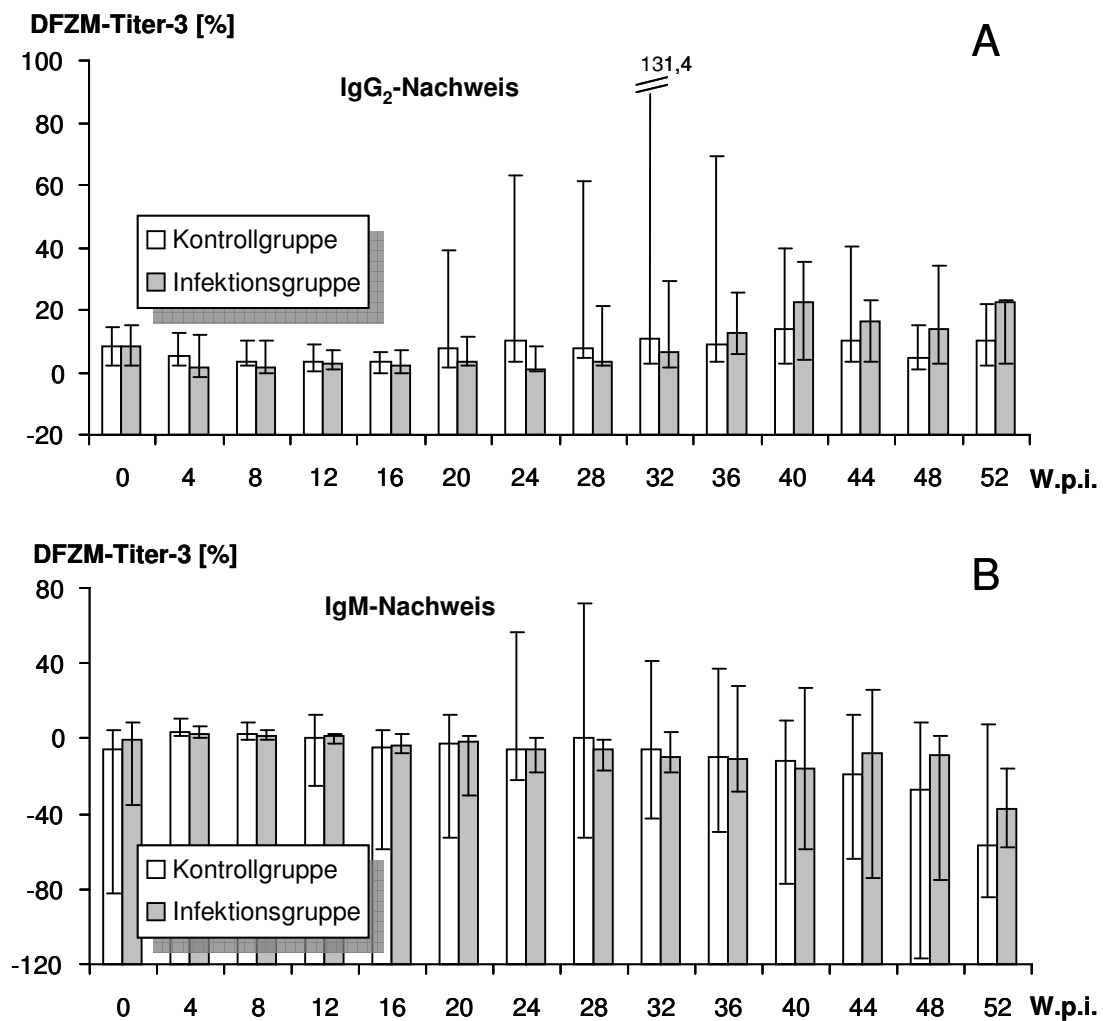


Abbildung 19: DFZM-Titer-3 bei den Kälber der Infektions- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der DFZM-Ak-Testvariante

Die Titerverteilung in der jeweiligen Gruppe ($n = 5$ bzw. $n = 6$) ist für jeden Messzeitpunkt als Median (Säule), Minimum und Maximum (Linien) dargestellt. Die statistische Analyse wurde anhand der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten Titer vorgenommen.

[A]: DFZM-IgG₂-Test

[B]: DFZM-IgM-Test

* signifikanter Mittelwertunterschied ($p \leq 0,05$; t-Test nach Student)

W.p.i.: Wochen *post infectionem*

Tabelle 16: Signifikanzwerte für die Faktoren Zeit und Gruppe in der zweifaktoriellen Varianzanalyse nach Greenhouse-Geissner

Test	Signifikanzwerte ¹ der zweifaktoriellen Varianzanalyse für versch. Faktoren		
	Zeit	Gruppe	Zeit x Gruppe
<u>DFZM-Ak-Testvarianten</u>			
DFZM-IgG-Test; ohne Präad.	0,117	0,462	0,236
DFZM-IgG-Test; MAA-Präad.	0,099	0,255	0,017
DFZM-IgG-Test; MP-Präad.	0,233	0,065	0,011
DFZM-IgG ₁ -Test; ohne Präad.	0,557	0,991	0,182
DFZM-IgG ₁ -Test; MAA-Präad.	0,487	0,238	0,007
DFZM-IgG ₁ -Test; MP-Präad.	0,033	0,156	0,002
DFZM-IgG ₂ -Test; ohne Präad.	0,322	0,391	0,377
DFZM-IgG ₂ -Test; MAA-Präad.	0,240	0,640	0,206
DFZM-IgG ₂ -Test; MP-Präad.	0,396	0,226	0,443
DFZM-IgM-Test; ohne Präad.	0,110	0,159	0,214
DFZM-IgM-Test; MAA-Präad.	0,021	0,328	0,064
DFZM-IgM-Test; MP-Präad.	0,005	0,758	0,550
<u>Pourquier®-ELISA</u>	0,173	0,181	0,240

Erläuterungen:

¹ Berechnung aus den Titern der Kälber in der Kontroll- und der Infektionsgruppe ab der 20. W.p.i

Präad.: Präadsorption

Fettgedruckte Zahlen: p-Werte ≤ 0,05

Tabelle 17: Signifikanzwerte des Mittelwertvergleichs zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe mit dem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben

W.p.i.	Signifikanzwerte ¹ des Mittelwertvergleichs der Ergebnisse aus der Kontroll- und der Infektionsgruppe			
	DFZM-IgG-Test (MP-Präad.)	DFZM-IgG-Test, (MAA-Präad.)	DFZM-IgG ₁ -Test, (MP-Präad.)	DFZM-IgG ₁ -Test, (MAA-Präad.)
20	0,410	0,097	0,307	0,100
24	0,269	0,154	0,204	0,186
28	0,064	0,159	0,237	0,154
32	0,139	0,257	0,174	0,340
36	0,416	0,129	0,188	0,245
40	0,081	0,329	0,203	0,015
44	0,055	0,104	0,024	0,016
46	0,021	0,032	0,096	0,011
48	0,019	0,029	0,010	0,023
50	0,037	0,007	0,030	0,059
52	0,028	0,000	0,011	0,012

Erläuterungen: ¹ unter Prüfung der Varianzgleichheit nach dem Levene-Test
W.p.i.: Wochen *post infectionem*
Präad.: Präadsorption
Fettgedruckte Zahlen: p-Werte $\leq 0,05$

4.5 Dynamik der MAP-spezifischen DFZM-Ak-Titer beim einzelnen Kalb

Um einzelne Antikörpertiter der Kälber aus der Infektionsgruppe diagnostisch als serologisch positiv, fraglich und negativ beurteilen zu können, wurden das 99 %ige und das 95 %ige Quantil aus allen im gesamten Zeitraum ermittelten Titerwerten der 6 Kontrollkälber als Cut Off-Werte eingeführt. Die auf diese Weise berechneten Cut Off-Werte sind der **Tabelle 18** zu entnehmen. Im Folgenden wurden nur die Ergebnisse der DFZM-Testvarianten in Verbindung mit einer Präadsorption der Serumproben mit MP betrachtet.

Im DFZM-IgG-Test wiesen aus der Infektionsgruppe initial Kalb 11, Kalb 12 bzw. Kalb 14 positive bzw. fragliche DFZM-Titer-3 bis zur 4., 8. bzw. 12. W.p.i. auf (**Abbildung 20B**). Beim Nachweis von IgG₁ wies nur Kalb 11 positive Werte bis zur 8. W.p.i. auf (**Abbildung 20D**). Die Titer der Kälber 12 und Kalb 14 waren in der ersten Beprobung fraglich (0 W.p.i., 9. Lebenstag).

Im DFZM-IgG-Test reagierten die Kälber 8 und 10 ab der 44. bzw. 46. W.p.i. konstant positiv. Kalb 8 erzielte bereits vorher wiederholt positive und fragliche Resultate (20., 28. und 32. W.p.i.). Der DFZM-IgG₁-Test ergab bei den Kälbern 8 und 10 ab der 50. bzw. 46. W.p.i. positive bzw. fragliche Ergebnisse. Bei Kalb 14 wurde in der letzten Untersuchung (51. W.p.i.) ein fraglicher Titerwert gemessen. Im DFZM-IgG₂-Test blieben alle Kälber über den gesamten Untersuchungszeitraum serologisch negativ (**Abbildung 20F**). Im DFZM-IgM-Test wiesen nur manche Kälber und auch nur an einzelnen Messtagen fragliche Resultate auf: Kalb 10 am 44. W.p.i., Kalb 12 am 36. W.p.i. und Kalb 14 am 40. W.p.i. (**Abbildung 20H**). Ansonsten lagen alle ermittelten Titerwerte im serologisch negativen Bereich.

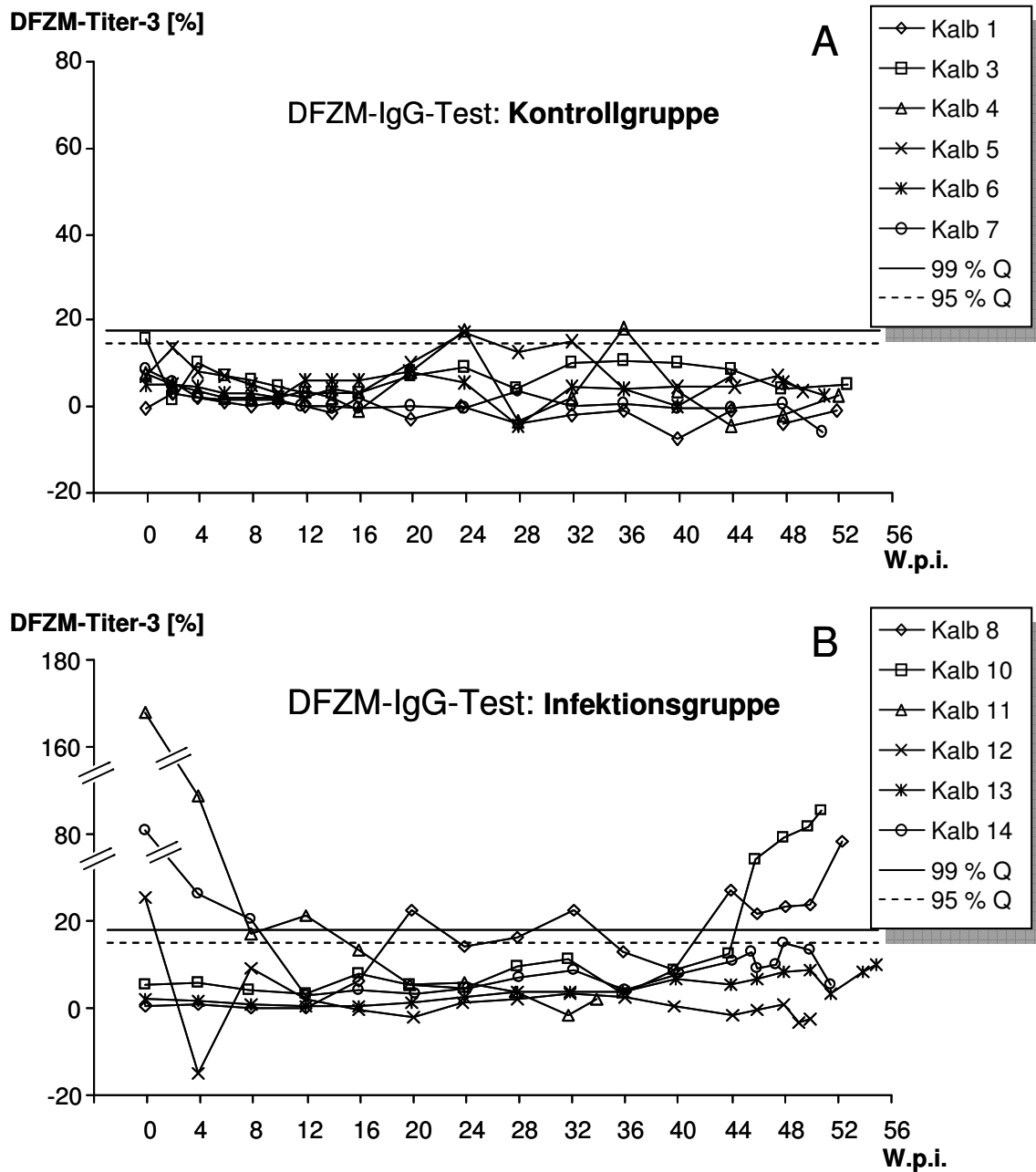
Tabelle 18: Festlegung der Cut Off-Werte für die DFZM-Ak-Testvarianten und den Pourquier®-ELISA

	Anzahl der berücksichtigten Titer der Kontrollgruppe	Cut Off zwischen serologisch positiv und fraglich (99 %iges Quantil) ¹	Cut Off zwischen serologisch negativ und fraglich (95 %iges Quantil) ¹
<u>DFZM-Ak-Tests</u>			
DFZM-IgG-Test	95	17,8	14,8
DFZM-IgG₁-Test	95	34,3	22,2
DFZM-IgG₂-Test	84	79,9	59,2
DFZM-IgM-Test	84	58,9	20,2
<u>Pourquier®-ELISA</u>	95	20,9	7,5

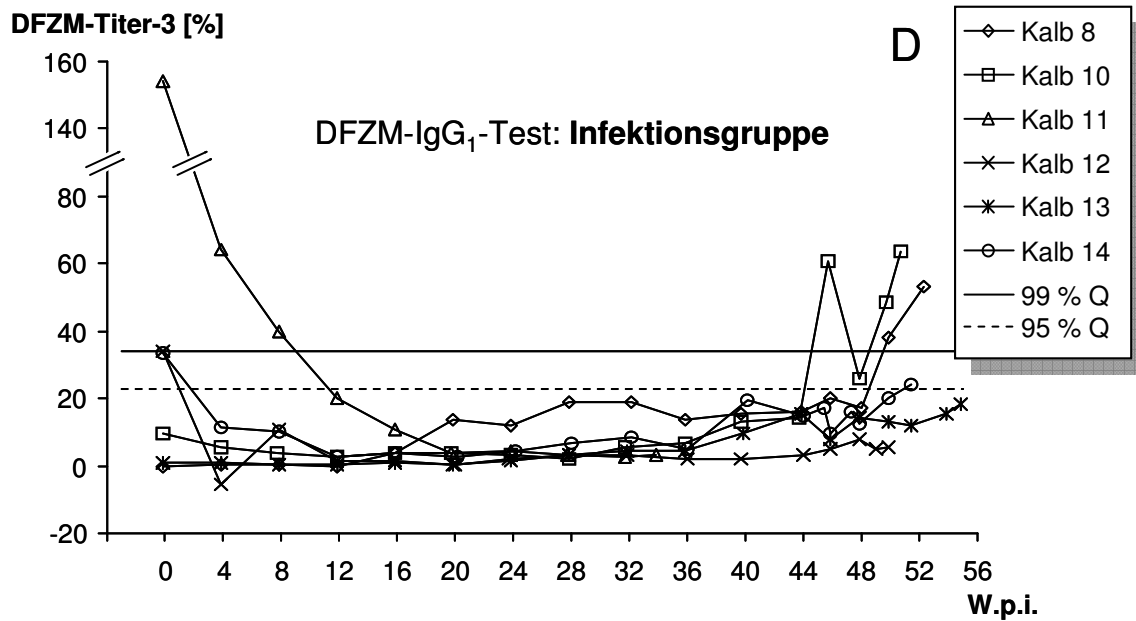
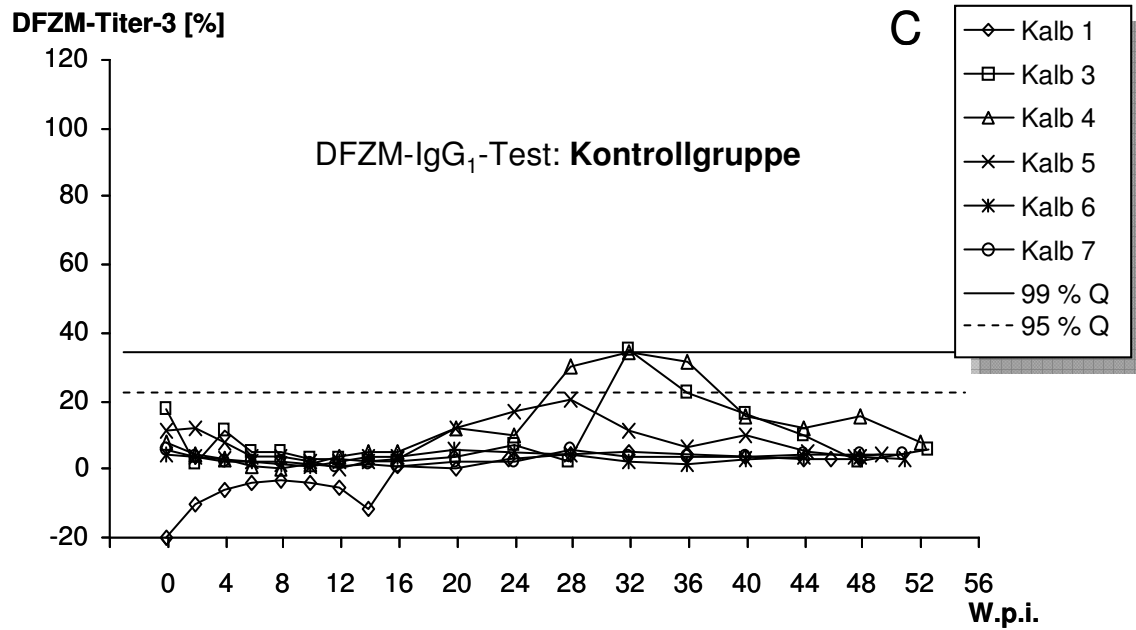
Erläuterungen:

¹

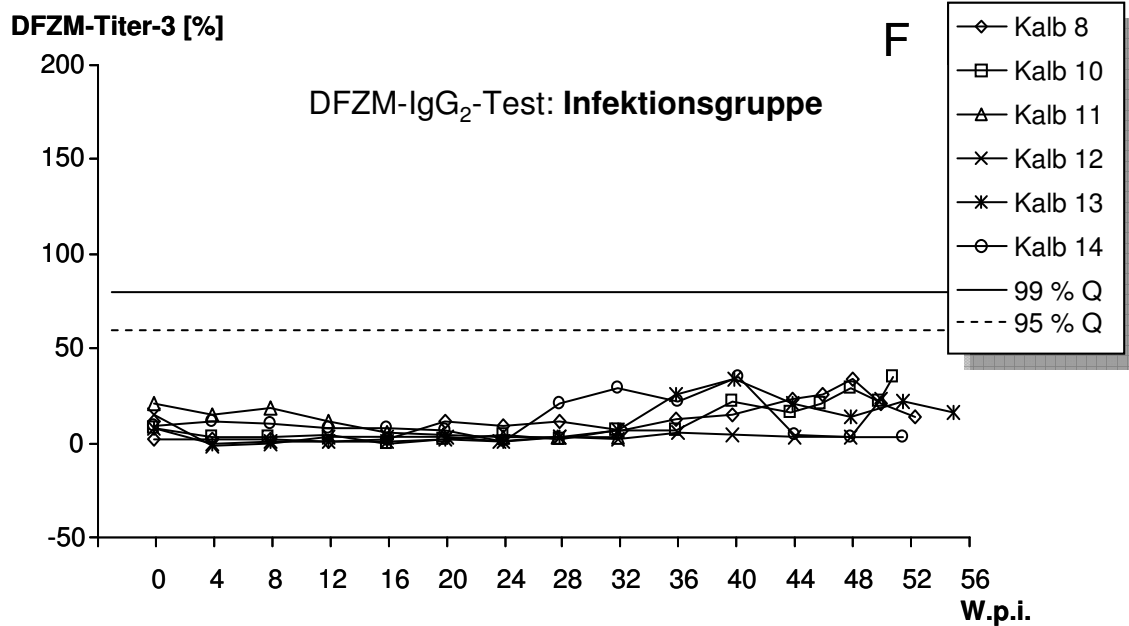
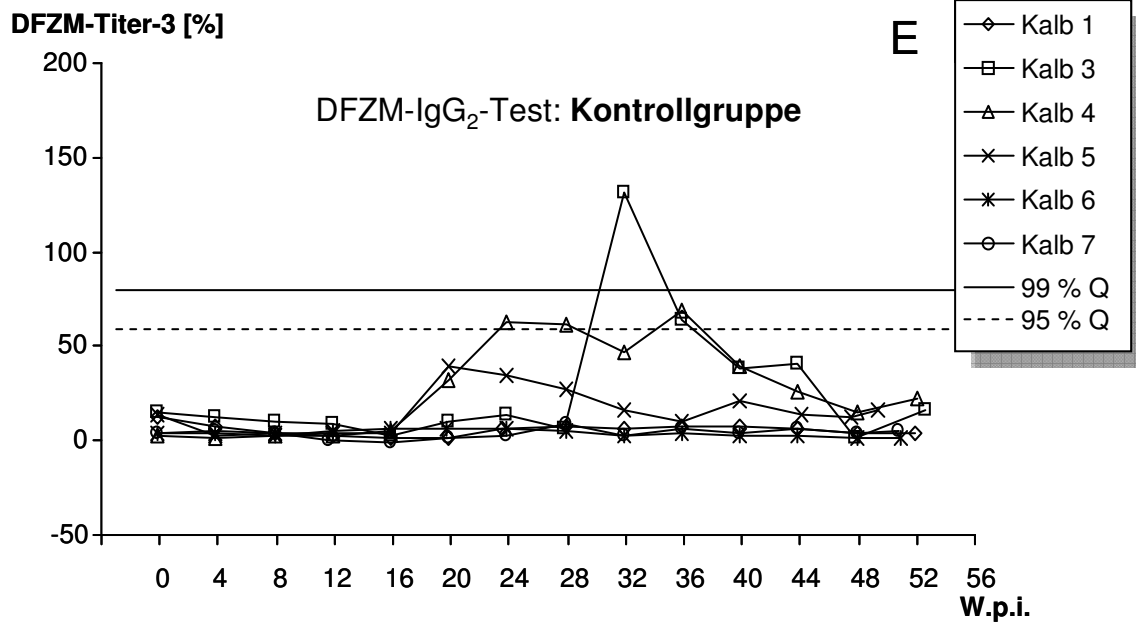
Quantile aller bei den Kontrolltieren im Untersuchungszeitraum ermittelten Titern



Fortsetzung der **Abbildung 20** auf der nächsten Seite



Fortsetzung der **Abbildung 20** auf der nächsten Seite



Fortsetzung der **Abbildung 20** auf der nächsten Seite

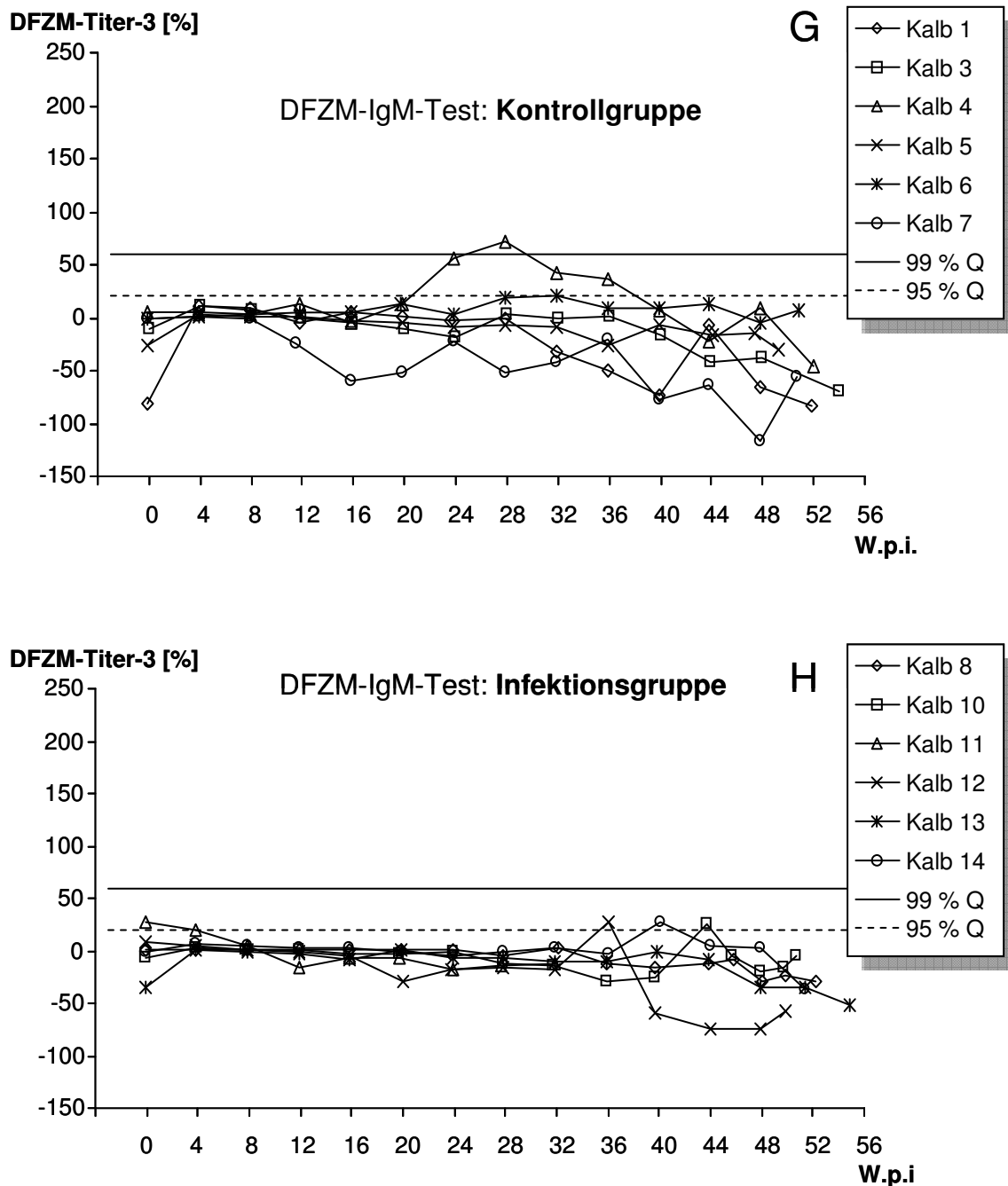


Abbildung 20: Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei MAP-infizierten Kälbern und Kontrollkälbern

(Ergebnisse der DFZM-Ak-Testvarianten, MP-Präadsorption; DFZM-Titer-3)

Als Cut Off-Werte dienen das 99 %ige bzw. 95 %ige Quantil (Q), berechnet anhand aller in der Kontrollgruppe ermittelten Titer.

[A]: DFZM-IgG-Test; Kontrollgruppe
 [B]: DFZM-IgG-Test; Infektionsgruppe
 [C]: DFZM-IgG₁-Test; Kontrollgruppe
 [D]: DFZM-IgG₁-Test; Infektionsgruppe

[E]: DFZM-IgG₂-Test; Kontrollgruppe
 [F]: DFZM-IgG₂-Test; Infektionsgruppe
 [G]: DFZM-IgM-Test; Kontrollgruppe
 [H]: DFZM-IgM-Test; Infektionsgruppe

W.p.i.: Wochen *post infectionem*

4.6 Antikörpertiter im Pourquier®-ELISA

Die Serumproben der Kälber in der Kontroll- und in der Infektionsgruppe wurden neben den DFZM-Ak-Tests auch mit dem kommerziell erhältlichen Pourquier®-ELISA untersucht. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in gleicher Weise wie bei den Ergebnissen der DFZM-Ak-Tests.

Bei der Analyse der Ergebnisse im Pourquier®-ELISA konnte hinsichtlich der Titer keine positive Wechselbeziehung zwischen den Faktoren Zeit und Gruppe festgestellt werden (**Tabelle 16**). Somit entfiel die statistische Untersuchung auf signifikante Mittelwertunterschiede zwischen der Infektions- und Kontrollgruppe. In **Abbildung 21** sind die Mediane der DFZM-Titer-3 der MAP-infizierten Kälber und der nicht-infizierten Kälber im Pourquier®-ELISA dargestellt.

Bei Verwendung der vom Hersteller angegebenen Cut Off-Werte war nur Kalb 11 und dieses nur bei der ersten Beprobung (0 W.p.i.) als serologisch positiv zu bewerten (**Abbildung 22**). Bei Kalb 8 stieg der Titer ab der 44. W.p.i. kontinuierlich an und lag ab der 50. W.p.i. im fraglichen Bereich.

Wurden in Analogie zu den DFZM-Ak-Tests das 99 %ige und das 95 %ige Quantil aller Titer in der Kontrollgruppe als Cut Off-Werte verwendet, erzielte Kalb 11 bis 8 W.p.i. positive und fragliche Resultate. Kalb 10 und 12 wiesen anfänglich ebenfalls Antikörpertiter im fraglichen Bereich auf. Kalb 8 reagierte ab der 44. W.p.i. fraglich oder seropositiv. Kalb 14 war 16 und 20 W.p.i. serologisch fraglich und Kalb 13 in der 54. W.p.i. serologisch positiv.

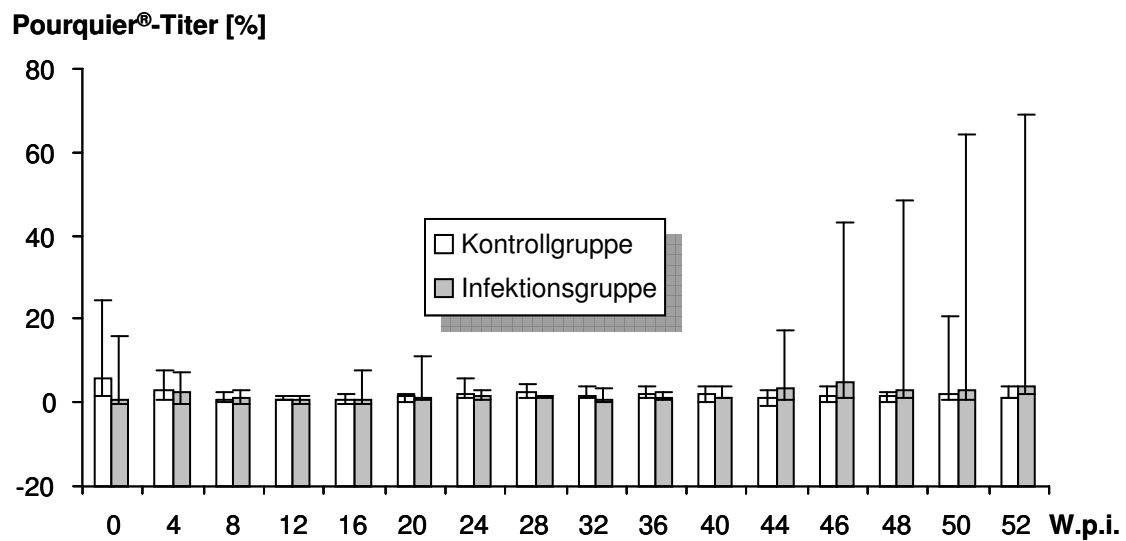


Abbildung 21: Pourquier®-Titer der MAP-infizierten Kälber und der nicht-infizierten Kontrollkälber

Die Titerverteilung in der jeweiligen Gruppe ($n = 5$ bzw. $n = 6$) ist für jeden Messzeitpunkt als Median (Säule), Minimum und Maximum (Linien) dargestellt. Die statistische Analyse wurde anhand der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten Titer vorgenommen.

* signifikanter Mittelwertunterschied ($p \leq 0,05$; t-Test nach Student)

W.p.i.: Wochen *post infectionem*

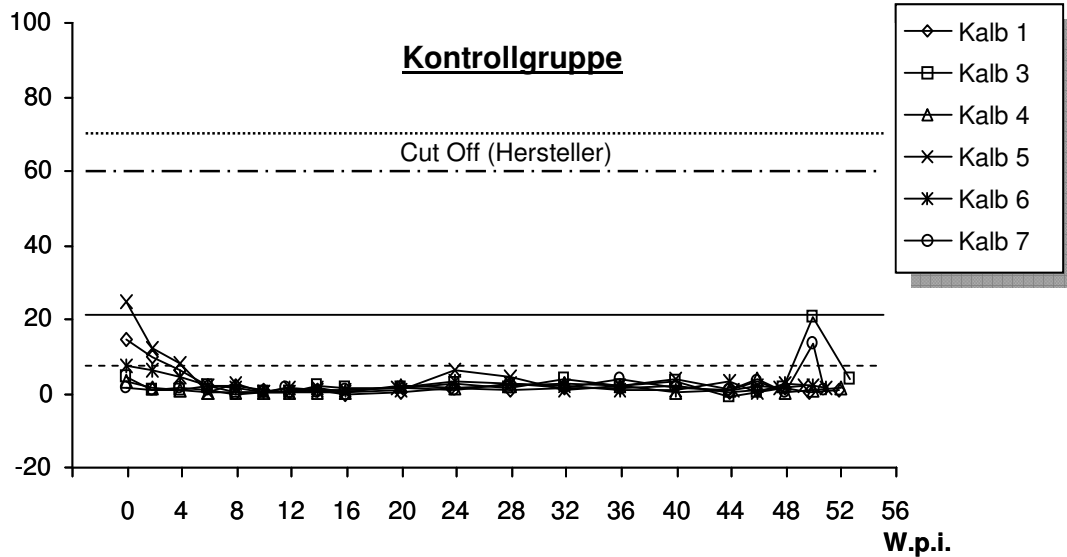
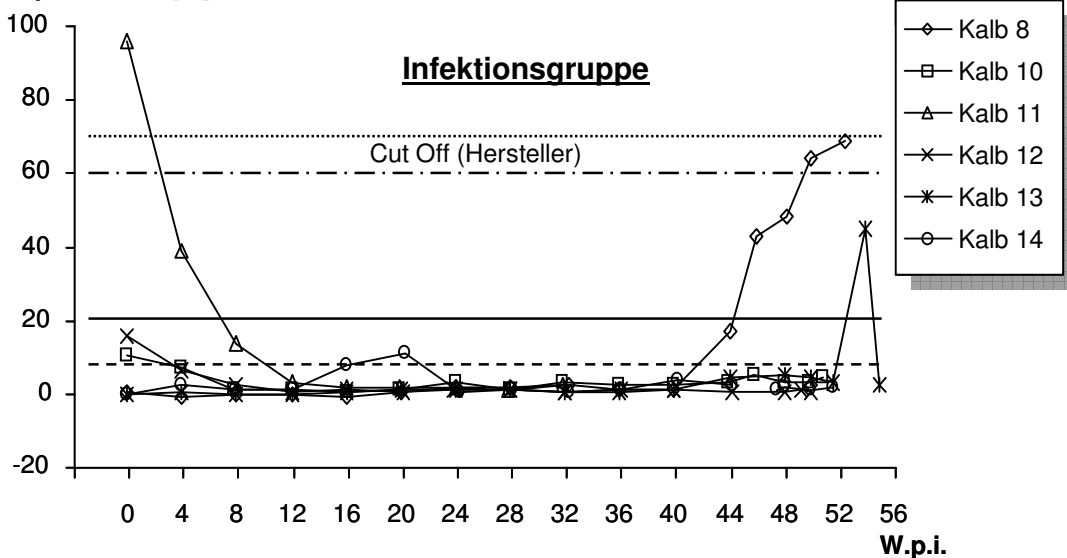
Pourquier®-Titer [%]**Pourquier®-Titer [%]**

Abbildung 22: Dynamik des Pourquier®-Titers bei MAP-infizierten Kälbern und Kontrollkälbern

[A]: Kontrollgruppe

[B]: Infektionsgruppe

— 99 %iges Quantil und

----- 95 %iges Quantil ermittelt aus allen Titerwerten der Kontrollgruppe

..... Cut Off-Wert zwischen serologisch positiv und fraglich sowie

— · — · — Cut Off-Wert zwischen serologisch negativ und fraglich, welche vom Hersteller angegeben wurden

W.p.i.: Wochen *post infectionem*

4.7 Ergebnisse der kulturell-bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchungen

Von den Kälbern wurden Kotproben in den ersten 2 Wochen nach den Inokulationen in zweitägigem Abstand entnommen. Danach wurden Proben für 2 Wochen im wöchentlichen Abstand genommen und anschließend bis zum Ende der Studie im 14-Tage-Rhythmus. Am 14., 30., 90. und 170. Tag *post infectionem* (T.p.i.) wurden zusätzlich Bioptate des Ileocaecallymphknotens und/oder eines Jejunal-lymphknotens untersucht. Im Zuge der Sektion wurden weitere Gewebeproben (Darmbein- und Buglymphknoten, Jejunum, Ileum, Colon, Ileocaecalklappe, Uterus) entnommen und ebenfalls der kulturell-bakteriologischen und molekularbiologischen MAP-Untersuchungen am IFTN zugeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden ausführlich in einer anderen Dissertation beschrieben werden (M. Fischer, dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Manuskript in Vorbereitung). Um die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Immunreaktionen bewerten zu können, wird hier nur eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse präsentiert.

Alle Kälber der Kontrollgruppe reagierten in allen Untersuchungen auf MAP in Gewebe- und Kotproben stets negativ. Dagegen schieden alle Kälber der Infektionsgruppe MAP intermittierend bis zum 139. T.p.i. aus. Von diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Versuchszeitraumes konnte MAP im Kot der Kälber nicht mehr nachgewiesen werden. Bei allen 6 Kälbern der Infektionsgruppe war MAP am 90. Tag *post infectionem* sowohl kulturell-bakteriologisch als auch molekularbiologisch in Gewebeproben aus dem Ileocaecallymphknoten und/oder einem Jejunal-lymphknoten nachweisbar (**Tabelle 19**). Am Tag der Sektion, welche je nach Kalb zwischen dem 351. und 375. T.p.i. stattfand, konnte MAP kulturell-bakteriologisch bei 3 von 5 Kälbern (Kälber 8, 12, 14) nicht mehr nachgewiesen werden, und molekularbiologisch bei 2 von 5 Kälbern (Kälber 13 und 14).

Tabelle 19: Ergebnisse der kulturell-bakteriologischen und molekularbiologischen Untersuchung von Gewebeproben der Kälber der Infektionsgruppe auf MAP

(Ergebnisse aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig Universität, Gießen)

Kalb	Kulturell-bakteriologische Untersuchung ¹					Molekularbiologische Untersuchung ²				
	14. T.p.i.	30. T.p.i.	90. T.p.i.	170. T.p.i.	351.- 375. T.p.i.	14. T.p.i.	30. T.p.i.	90. T.p.i.	170. T.p.i.	351.- 375. T.p.i.
8	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
10	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
11	-	+	+	+	n.u.	-	-	-	+	n.u.
12	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
13	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-

Erläuterungen:

- ¹ Anzucht auf HEYM-Agar oder mittels MGIT
² Nested-PCR IS900 nach Bull (2003); Triplex Real time PCR nach Schönenbrücher *et al.*, (2008)
 + Direktnachweis von MAP in einer der Untersuchungen
 n.u. nicht untersucht, da das Kalb am 253. Lebenstag verstarb
 T.p.i. Tag *post infectionem*

5 Ergebnisse der Feldstudien

5.1 Nachweis MAP-spezifischer maternalen Antikörper bei Kälbern und Jungrindern (Kohortenstudie 1)

Die Kohortenstudie 1 befasste sich mit der Dynamik von MAP-spezifischen Antikörpern kolostralen Ursprungs bei Kälbern in den ersten 6 Lebensmonaten. Ziel dieser Untersuchung war es insbesondere, denjenigen Zeitpunkt zu erfassen, an dem diese Antikörper abgebaut sind und vorhandene Antikörper somit auf den von infizierten Kälbern selbst gebildeten Immunglobulinen beruhen. Im Rahmen der Kohortenstudie 1 wurden insgesamt 12 weibliche Kälber eines MAP-Problembetriebes (Betrieb 9) ab der 1. oder 2. Lebenswoche untersucht. In Abhängigkeit davon, wie die Kälber nach der Aufnahme von Kolostrum im DFZM-IgG- und DFZM-IgG₁-Test reagierten, wurden sie der Gruppe der Kälber mit initialen MAP-Antikörpertitern („seropositive Kälber“) oder der Gruppe ohne initiale MAP-Antikörpertiter („seronegative Kälber“) zugeordnet. Jede Gruppe umfasste 6 Kälber. Der Cut Off-Wert zur Differenzierung zwischen seropositiv und seronegativ zu bewertenden Antikörpertitern wurde anhand der bei den Kontrolltieren in der experimentellen Infektionsstudie ermittelten Messwerte errechnet. Die berechneten Cut Off-Werte sind in **Tabelle 18** (Seite 97) aufgelistet. Zusätzlich wurden die Muttertiere der Kälber mindestens zweimal im Abstand von ca. 2 Monaten beprobt (Kot- und Serumproben). Alle Serumproben wurden nach der Präadsorption mit MP-Antigen im DFZM-IgG- und im DFZM-IgG₁-Test auf ihren DFZM-Titer-3 untersucht.

Alle 6 Muttertiere der 6 seronegativen Kälber reagierten im DFZM-IgG- und DFZM-IgG₁-Test in der ersten Untersuchung negativ (**Tabelle 20**). Bei der zweiten Untersuchung reagierte ein Muttertier 79 Tage nach der Geburt serologisch fraglich bzw. positiv. Bei der kulturell-bakteriologischen Untersuchung von Kot auf MAP wies das Muttertier von Kalb „Feld K2“ 14 Tage nach der Geburt ein positives Ergebnis auf. Von den 6 Muttertieren der seropositiven Kälber reagierten 5 Kühe in beiden Untersuchungen mittels DFZM-IgG- oder DFZM-IgG₁-Test seropositiv, während die Mutter von Kalb „Feld K14“ seronegativ reagierte. Aus organisatorischen Gründen konnte diese Kuh leider nur einmal und zwar einen Tag nach der Geburt beprobt werden. Bis auf dieses Tier reagierten alle Muttertiere der seropositiven Kälber auch mindestens einmal in der kulturell-bakteriologischen und/oder molekularbiologischen MAP-Untersuchung positiv.

Bei allen 6 seronegativen Kälbern blieben die MAP-spezifischen DFZM-Titer-3 sowohl bei der Untersuchung von IgG als auch bei der Untersuchung von IgG₁ über den gesamten Beprobungszeitraum im negativen Bereich (**Abbildung 23A, Abbildung 24A**).

Die 6 seropositiven Kälber blieben dagegen in Abhängigkeit vom Titer der ersten Untersuchung im DFZM-IgG-Test mindestens bis zum 20. und längstens bis zum 121. Lebenstag serologisch positiv bzw. fraglich (**Abbildung 23B**). Die IgG₁-Titer sanken dagegen schneller ab. So blieben die Titer bei 5 Kälbern nach dem 54. Lebenstag im negativen Bereich (**Abbildung 24B**). Nur bei einem einzigen Kalb (Feld K3) lag der Titer noch am 121. Lebenstag im fraglichen Bereich.

Im Pourquoi[®]-ELISA blieben unter Verwendung des vom Hersteller angegebenen Cut Off-Wertes alle seronegativen Kälber im Untersuchungszeitraum negativ. Drei der 6 seropositiven Kälber reagierten dagegen bis zum 60., 63. bzw. 104. Lebenstag serologisch positiv bzw. fraglich (**Abbildung 25**). Bei Verwendung der Cut Off-Werte aus der experimentellen Infektionsstudie, lagen die Titer von 4 der 6 initial seropositiven Kälber mindestens bis zum 22. und längstens bis zum 138. Lebenstag im positiven oder fraglichen Bereich.

Tabelle 20: Ergebnisse der serologischen Untersuchung (Pourquier®-ELISA, DFZM-IgG- und DFZM-IgG₁-Test) sowie der Kotuntersuchung (Kultur/PCR) von Muttertieren in der Kohortenstudie 1

Bezeichnung	Beprobungszeitpunkt [Tage nach der Geburt des Kalbes]	Ergebnis der Untersuchung		
		Pourquier®- ELISA	DFZM- IgG/IgG ₁ - Test	Kotunter- suchung (Kultur/PCR)
<u>Muttertiere seronegativer Kälber</u>				
M Feld K2	14	-	- / -	+ / -
	89	-	- / -	- / -
M Feld K4	9	-	- / -	- / -
M Feld K9	4	-	- / -	- / -
	81	-	- / -	- / -
M Feld K10	2	-	- / -	- / -
	79	?	+ / ?	- / ?
M Feld K11	3	-	- / -	- / -
	80	-	- / -	- / ?
M Feld K12	8	-	- / -	- / -
	85	-	- / -	- / -
<u>Muttertiere seropositiver Kälber</u>				
M Feld K3	-13	-	+ / +	- / +
	196	-	+ / +	- / -
M Feld K5	-178	+	+ / +	+ / +
M Feld K6	-266	-	+ / +	+ / -
	251	-	- / +	? / -
M Feld K13	-457	+	+ / ?	+ / -
	-239	+	+ / +	+ / +
M Feld K14	1	-	- / -	k.P.
M Feld K15	53	-	+ / ?	+ / +
	116	-	+ / +	+ / +

Erläuterungen:

k.P.: keine Probe
M: Muttertier
-: negatives Ergebnis
+: positives Ergebnis
?: fragliches Ergebnis

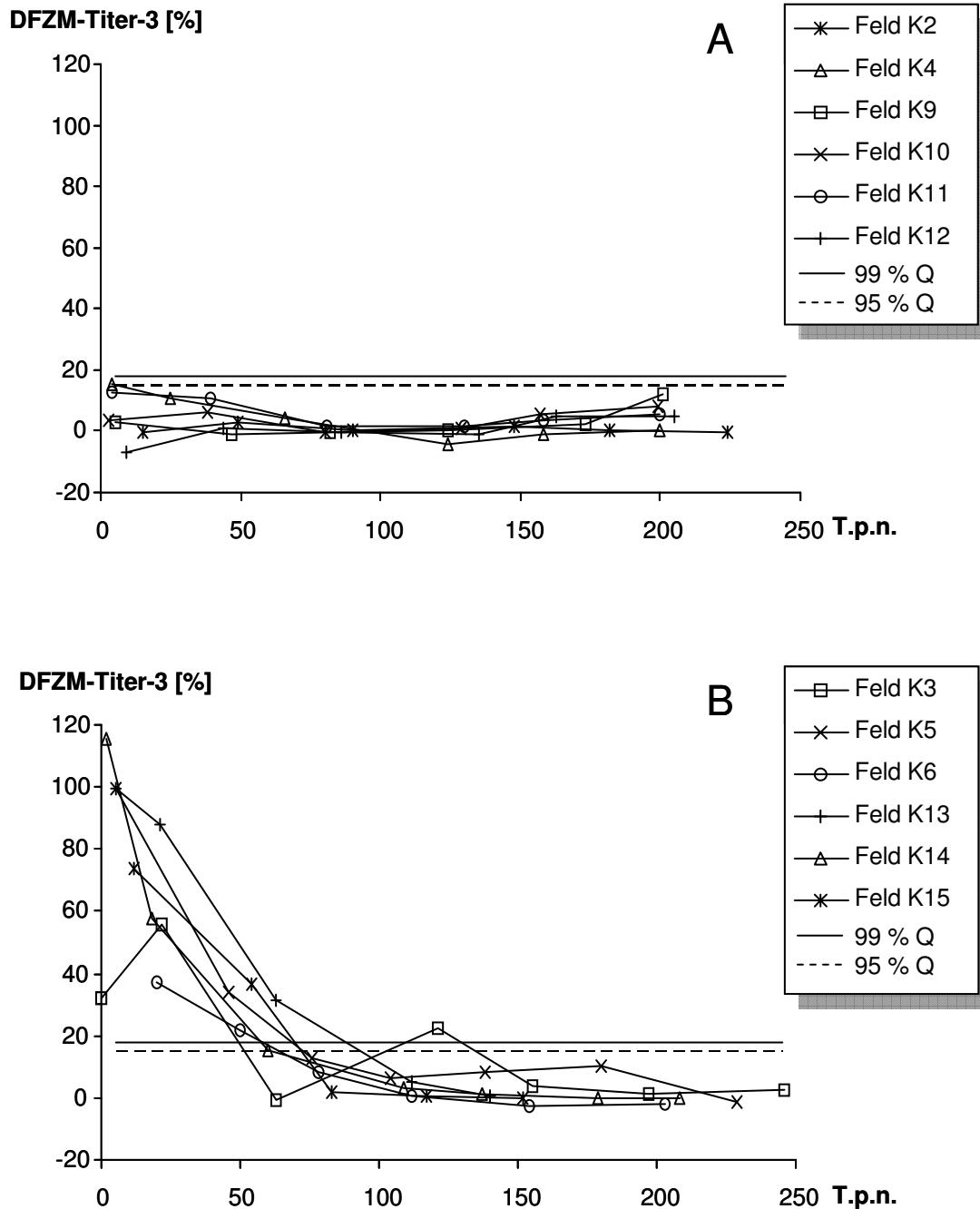


Abbildung 23: Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei Kälbern eines MAP-Problembetriebes (Kohortenstudie 1)

(Ergebnisse im DFZM-IgG-Test, MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3)

Als Cut Off-Werte dienen das 99 %ige und das 95 %ige Quantil (Q), berechnet anhand aller in der Kontrollgruppe der experimentellen Infektionsstudie ermittelten Titer.

[A]: seronegative Kälber (n = 6) mit initial negativen Antikörpertitern

[B]: seropositive Kälber (n = 6) mit initial positiven Antikörpertitern

T.p.n.: Tage *post natum*

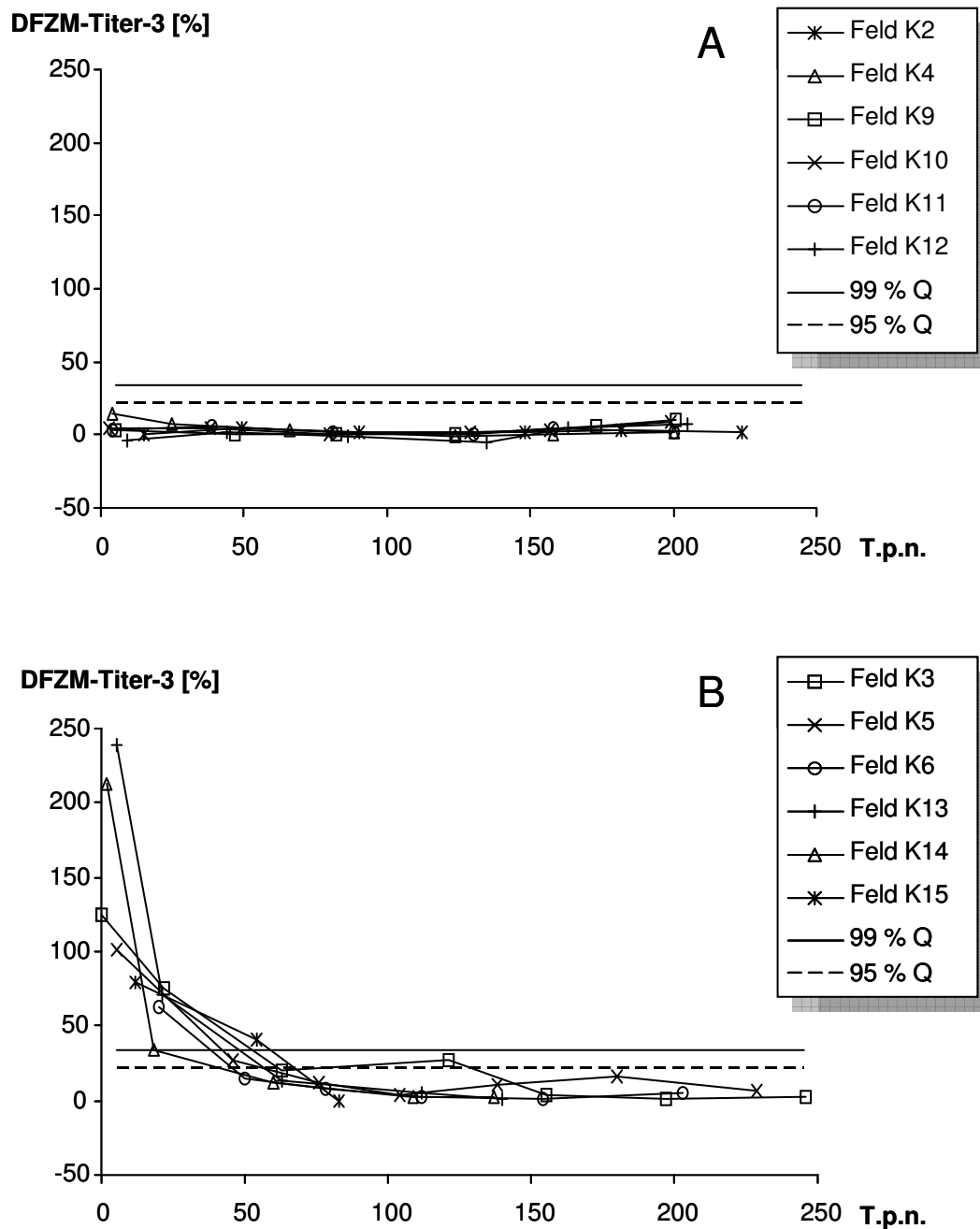


Abbildung 24: Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei Kälbern eines MAP-Problembetriebes

(Ergebnisse im DFZM-IgG₁-Test, MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3)

Als Cut Off-Werte dienen das 99 %ige und das 95 %ige Quantil (Q), berechnet anhand aller in der Kontrollgruppe der experimentellen Infektionsstudie ermittelten Titer.

[A]: seronegative Kälber (n = 6) mit initial negativen Antikörpertitern

[B]: seropositive Kälber (n = 6) mit initial positiven Antikörpertitern

T.p.n.: Tage *post natum*

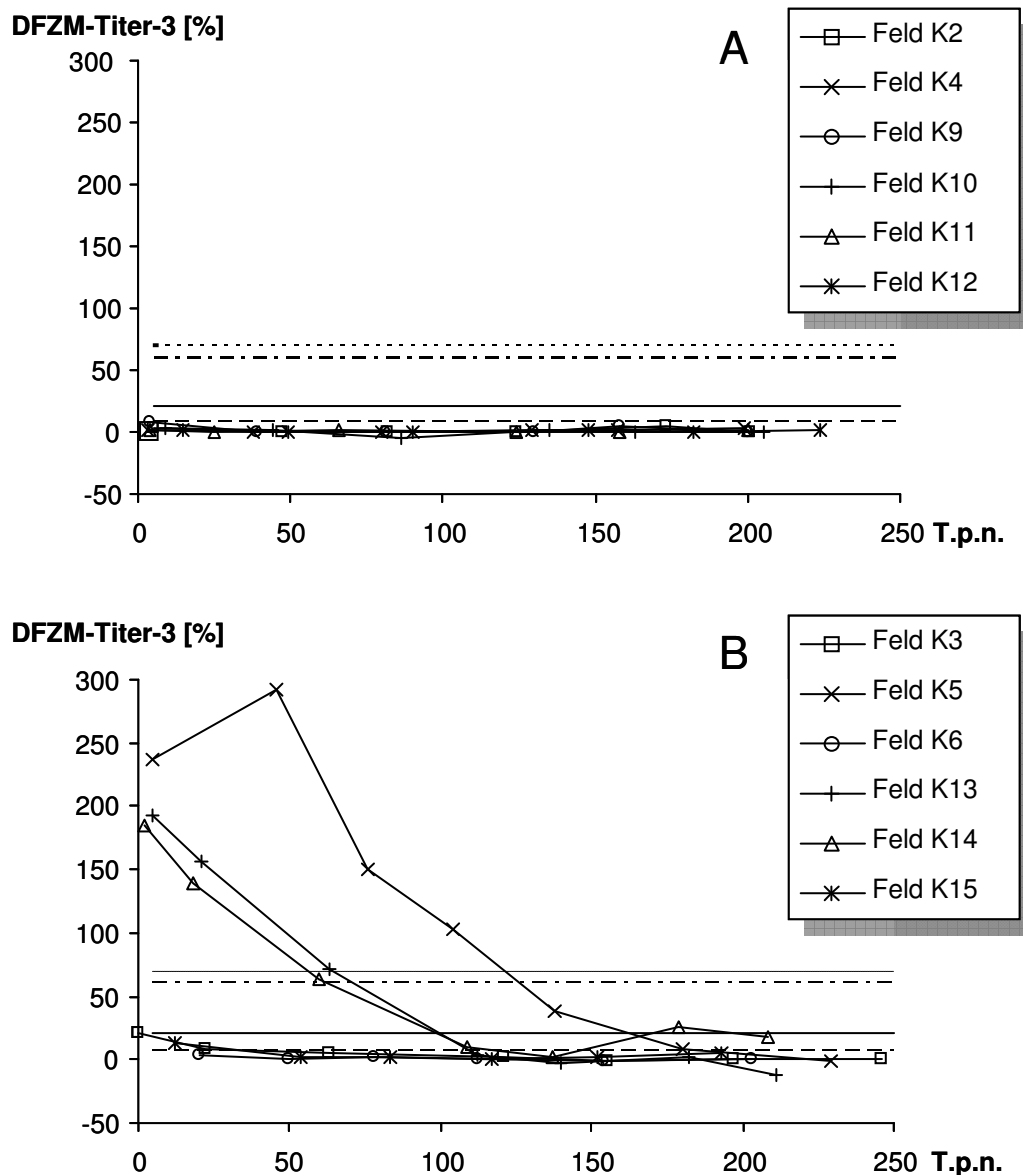


Abbildung 25: Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei Kälbern eines MAP-Problembetriebes

(Ergebnisse im Pourquier®-ELISA)

[A]: seronegative Kälber (n = 6) mit initial negativen Antikörpertitern

[B]: seropositive Kälber (n = 6) mit initial positiven Antikörpertitern

— 99 %iges Quantil und

----- 95 %iges Quantil ermittelt aus allen Titerwerten der Kontrollgruppe (experimentelle Infektionsstudie)

..... Cut Off-Wert zwischen serologisch positiv und fraglich sowie

- - - - - Cut Off-Wert zwischen serologisch negativ und fraglich, welche vom Hersteller angegeben wurden

T.p.n.: Tage *post natum*

5.2 Nachweis der MAP-spezifischen Serokonversion bei Jungrindern (Kohortenstudie 2)

Ziel der Kohortenstudie 2 war es, den Zeitpunkt der Serokonversion im Feld bei Jungrindern im Alter von 7 bis 22 Lebensmonaten näher einzugrenzen. Hierzu wurden Blut- und Kotproben von 24 Jungrindern aus einem MAP-Problembetrieb [Betrieb 9; Seroprävalenz (Pourquier®-ELISA) von 7,5 %; Prävalenz von MAP-Ausscheidern von 21,6 %] und 10 Jungrindern aus einem MAP-unverdächtigen Betrieb (Betrieb 3) in regelmäßigen Abständen entnommen. Die Erstbeprobung erfolgte im Alter von 7 bis 12 Monaten. Anschließend fanden 4 bis 5 weitere Beprobungen im Abstand von jeweils ca. 3 Monaten statt, bis die Rinder ein Alter zwischen 20 und 22 Monaten erreicht hatten. Die Serumproben wurden im DFZM-IgG- und DFZM-IgG₁-Test (MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3) sowie im Pourquier®-ELISA auf MAP-spezifische Antikörper untersucht.

Für den Vergleich der 2 Gruppen (Jungrinder des MAP-Problembetriebes und Jungrinder des MAP-unverdächtigen Betriebes) wurden die Daten nach dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurden sie logarithmisch transformiert und einem Mittelwertvergleich mittels einseitigem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben unterworfen. Die einzelnen Antikörpertiter der Tiere wurden außerdem anhand des 99 %igen und des 95 %igen Quantils, welche aus allen im gesamten Zeitraum ermittelten Titerwerten der 6 Kontrolltiere der experimentellen Infektionsstudie berechnet worden waren, diagnostisch beurteilt (**Tabelle 18**).

Im DFZM-IgG-Test wiesen die Jungrinder des MAP-Problembetriebes im 17.-18. und 21.-22. Lebensmonat im Mittel signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Titer auf als die Jungrinder des MAP-unverdächtigen Betriebes. Im 7.-8. Lebensmonat war es jedoch umgekehrt ($p \leq 0,05$). Im DFZM-IgG₁-Test unterschieden sich die Titer beider Gruppen über den gesamten Beprobungszeitraum im Mittel nicht voneinander ($p > 0,05$). Bei Verwendung des Pourquier®-ELISA wiesen die Jungrinder des MAP-unverdächtigen Betriebes im 17.-18. und 21.-22. Lebensmonat im Mittel signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Titer auf als die Jungrinder des MAP-Problembetriebes.

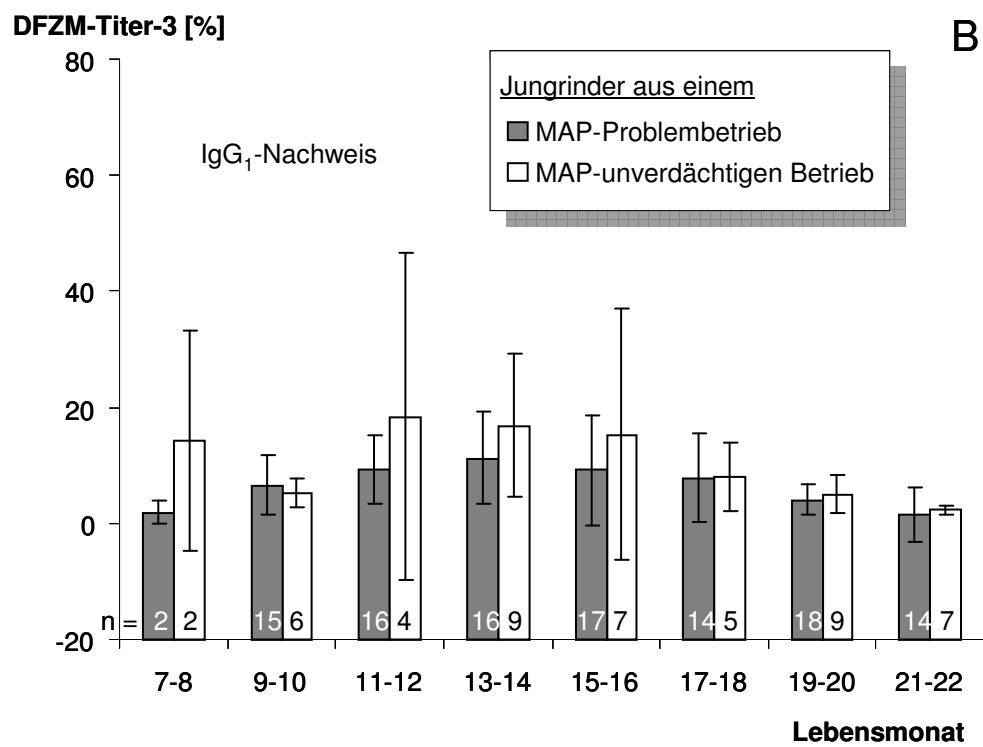
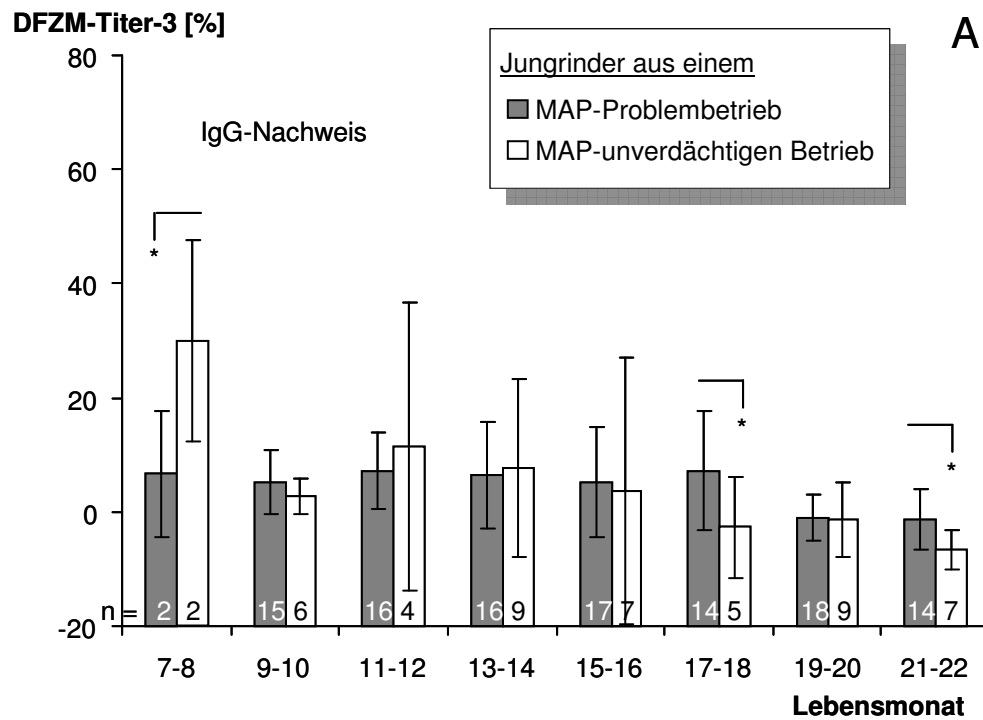
In der Einzeltierbetrachtung zeigten im DFZM-IgG-Test 6 bzw. 2 von 24 Jungrindern des MAP-Problembetriebes im Laufe des Beprobungszeitraumes mindestens zu einem Zeitpunkt einen Antikörpertiter im positiven oder fraglichen Bereich (**Abbildung 27**). Drei Rinder reagierten sogar in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen im Alter von 10, 14 bzw. 15 Lebensmonaten positiv. Von den 10 Jungrindern

aus dem MAP-unverdächtigen Betrieb waren 3 Rinder zu mindestens einem Beprobungszeitpunkt seropositiv oder serofraglich. Ein Jungrind wies im Alter von 11 Lebensmonaten in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen positive Testergebnisse auf.

Wurden die Jungrinder im DFZM-IgG₁-Test untersucht, ließen sich insgesamt 3 serologisch positive Rinder im Problembetrieb entdecken, die jeweils einmal im Alter von 14 bzw. 15 Monaten fraglich reagierten (**Abbildung 28**). Im MAP-unverdächtigen Betrieb reagierten 3 Rinder serologisch an mindestens einem Beprobungszeitpunkt positiv oder fraglich. Ein Jungrind war sogar in zwei aufeinander folgenden Untersuchungen positiv (12. und 13. Lebensmonat).

Der Pourquier[®]-ELISA erkannte unter Berücksichtigung der vom Hersteller angegebenen Cut Off-Werte nur ein Jungrind des MAP-Problembetriebes und ein Rind des MAP-unverdächtigen Betriebes als fraglich und dies auch nur zu jeweils einem einzigen Zeitpunkt im Alter von 20 bzw. 14 Monaten.

Von den parallel zur Entnahme der Serumproben entnommenen Kotproben wurden nur die Proben der ersten und den zwei letzten Beprobungen jedes Tieres im IFTN untersucht. Weder bei den Jungrindern im MAP-Problembetrieb noch bei den Rindern in den MAP-unverdächtigen Betrieben konnte dabei MAP mittels Anzuchtverfahren oder PCR in den Kotproben nachgewiesen werden.



Fortsetzung der **Abbildung 26** auf der nächsten Seite

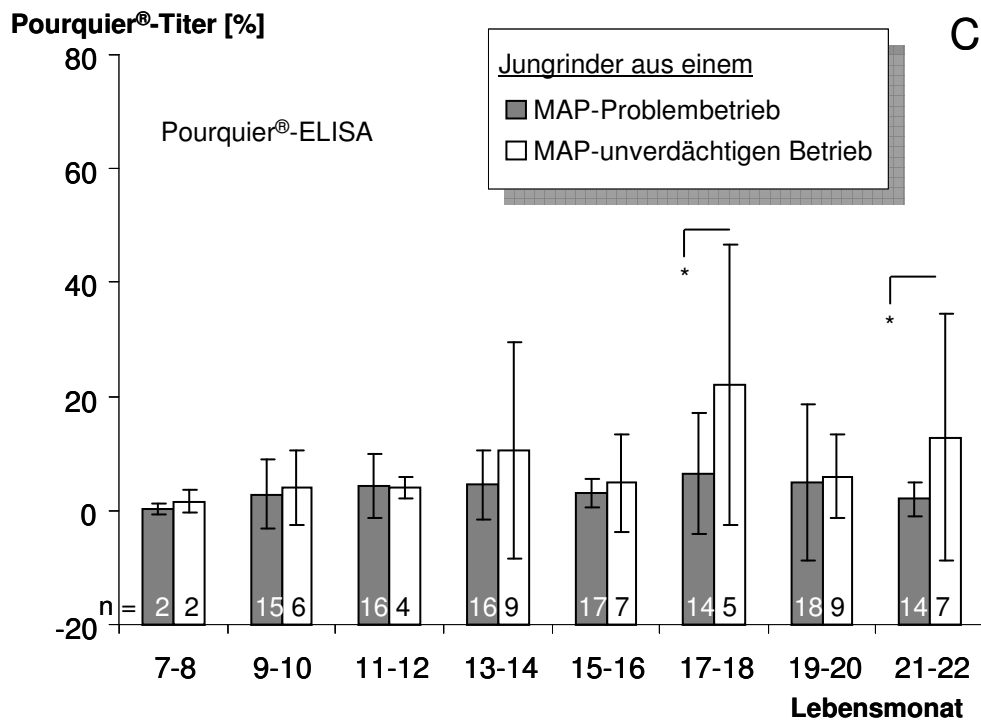


Abbildung 26: DFZM-Titer-3 bzw. Pourquier®-Titer bei Jungrindern aus einem MAP-Problembetrieb und einem MAP-unverdächtigen Betrieb in Abhängigkeit zum Lebensalter

Die Titerverteilung in der jeweiligen Gruppe ist für die entsprechenden Lebensmonate als Mittelwert (Säule) und Standardabweichung (Linien) dargestellt. Die statistische Analyse wurde anhand der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten Titerwerte vorgenommen.

- [A]: DFZM-IgG-Test
 [B]: DFZM-IgG₁-Test
 [C]: Pourquier®-ELISA

* signifikanter Mittelwertunterschied ($p \leq 0,05$; t-Test nach Student)
 n: Anzahl der untersuchten Rinder

Lebensmonat		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
MAP-Problembetrieb	Rind 1				5,72		1,83		0,41		-4,97						-16,42
	Rind 2		-2,18			-3,16		1,95			4,00				2,89		
	Rind 3			0,81		-0,42		9,60			26,64						0,76
	Rind 4					9,27		2,16			4,70						-0,06
	Rind 5				7,97			6,09			11,93				-4,81		
	Rind 6		17,31		15,02			10,51			2,67				2,80		
	Rind 7			10,34				13,13		2,48				-5,23		-3,80	
	Rind 8				-2,15			28,89		21,65				3,50			-0,81
	Rind 9			2,53				1,15		0,55					-11,02		
	Rind 10				3,86			7,75			23,04				3,82		
	Rind 11				14,20					26,89		22,51			1,40		
	Rind 12			5,14			3,06			2,70				-0,94		-1,81	
	Rind 13		15,83				17,65		8,35				7,93			2,89	
	Rind 14				-1,39				-3,45		-7,94						-3,20
	Rind 15			-1,51			-8,53		7,79					-2,34		5,73	
	Rind 16			7,23			1,22			3,94				-2,34		-4,28	
	Rind 17				10,81			12,33			2,71				2,80		
	Rind 18			37,42		18,96		9,85			1,36					4,61	
	Rind 19		1,13						-12,66					1,51	0,00		
	Rind 20		2,16			14,53			-2,78					-4,11	-3,20		
	Rind 21			8,03			-3,37		17,95					-3,13		-0,39	
	Rind 22		1,24			6,32		7,53					6,97		3,42		
	Rind 23			12,45		10,18		-6,82					-0,60			0,57	
	Rind 24	2,20			7,33		5,19			1,25					0,41		
MAP-unverdächtiger Betrieb	Rind 25				-1,44			13,40			-15,18		-8,56				-6,27
	Rind 26			7,54			-3,57			-19,26			-1,22				-12,06
	Rind 27			1,73				-4,19			-5,79		-6,65				-8,58
	Rind 28			3,20			29,89			-8,79			-3,70				-6,65
	Rind 29				3,98			-6,24			-1,50				-1,98		
	Rind 30			1,91			-5,54			-2,00			-4,29				-6,01
	Rind 31			-1,99			-2,03			2,29			4,80			-5,38	
	Rind 32		42,36				-5,40			53,61		9,04			11,64		
	Rind 33	17,49				49,01		33,53			-4,30				8,32		
	Rind 34			4,28				14,28		3,82			0,38				-1,09

Abbildung 27: Nachweis einer MAP-spezifischen Serokonversion bei Jungtieren eines MAP-Problembetriebes und eines MAP-unverdächtigen Betriebes mit dem DFZM-IgG-Test

Als Cut Off-Werte dienen das 99 %ige Quantil (17,8 %) und das 95 %ige Quantil (14,8 %), berechnet anhand aller in der Kontrollgruppe der experimentellen Infektionsstudie ermittelten Titer.

Zahlen in den Balken: DFZM-Titer-3 [%]

Rote Balken:

positiver Befund

Orangefarbene Balken:

fraglicher Befund

Grüne Balken:

negativer Befund

Blaue Rahmen:

fraglicher Befund im Pourquier®-ELISA (Cut Off-Werte des Herstellers)

Lebensmonat		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
MAP-Problembetrieb	Rind 1				11,62		3,77			-10,26		3,76					-12,79
	Rind 2			0,90		2,95			4,95				-9,66			2,57	
	Rind 3			6,22		3,51			8,58				18,00				3,10
	Rind 4					7,41			8,43				6,99				1,86
	Rind 5				6,90			6,40				11,37			5,30		
	Rind 6		15,77		18,09			21,80				13,25			6,54		
	Rind 7			9,04				20,16		13,95				5,59		-3,25	
	Rind 8				8,77			25,22		19,59				8,47			4,36
	Rind 9			3,38				11,87		2,64					1,96		
	Rind 10				9,65			11,71				5,50			3,84		
	Rind 11				16,07					26,65		21,66			2,93		
	Rind 12			4,26			7,26				6,54			3,08		2,18	
	Rind 13		2,86				16,06		12,50				10,26			3,83	
	Rind 14				-0,19				0,46		1,44					1,97	
	Rind 15		3,85				-4,65		13,44					2,49		1,48	
	Rind 16			4,00			10,95				13,14			8,99		4,49	
	Rind 17				-0,64			16,62				11,27			8,59		
	Rind 18			14,76		18,28		15,77				5,35				3,84	
	Rind 19		1,06						-0,22					5,97	0,59		
	Rind 20		3,56			14,55			5,08					0,70	1,67		
	Rind 21		8,11				3,03		26,41					2,07		6,16	
	Rind 22		3,46			11,42		10,35					5,83		2,73		
	Rind 23		5,30			12,14		4,12					3,76			3,13	
	Rind 24	0,42			15,87		7,46				3,94				2,36		
MAP-unverdächtiger Betrieb	Rind 25				4,08			13,22			4,22		1,86				2,31
	Rind 26			7,05			8,36			5,56			3,63				2,23
	Rind 27			6,44				15,30			6,23		2,59				1,76
	Rind 28			4,17			26,94		10,72				5,14				3,39
	Rind 29				5,63			9,98			10,72			6,25			
	Rind 30			8,18			11,86			11,97			0,95				3,23
	Rind 31			1,13			7,39		5,57				8,21		0,88		
	Rind 32		27,57				3,36			63,65		16,98			10,93		
	Rind 33	0,73				60,55		45,82			2,29				5,70		
	Rind 34		4,02				12,81		7,13				2,15			2,25	

Abbildung 28: Nachweis einer MAP-spezifischen Serokonversion bei Jungrindern eines MAP-Problembetriebes und eines MAP-unverdächtigen Betriebes mit dem DFZM-IgG₁-Test

Als Cut Off-Werte dienten das 99 %ige Quantil (34,3 %) und das 95 %ige Quantil (22,2 %), berechnet anhand aller in der Kontrollgruppe der experimentellen Infektionsstudie ermittelten Titer.

Zahlen in den Balken: DFZM-Titer-3 [%]

Rote Balken: positiver Befund

Orangefarbene Balken: fraglicher Befund

Grüne Balken: negativer Befund

Blaue Rahmen: fraglicher Befund im Pourquier®-ELISA (Cut Off-Werte des Herstellers)

V Diskussion

In der hier vorliegenden Studie wurde die von Eda *et al.* (2005) entwickelte und auf der Durchflussszytometrie basierende Methode zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper (DFZM-IgG-Test) gezielt optimiert und hinsichtlich ihrer Eignung zur serologischen Diagnostik von MAP-Infektionen an Kälbern, Jungrindern und adulten Rindern evaluiert. Geht man davon aus, dass sich Rinder tatsächlich v.a. in den ersten Lebensmonaten mit MAP infizieren, dann wäre es das vorrangige Ziel der serologischen Frühdiagnostik, MAP-infizierte Tiere innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zuverlässig zu erkennen, das heißt bevor die Tiere anfangen, den Erreger über den Kot auszuscheiden und andere Tiere anstecken zu können. Aus ökonomischen Gründen wäre es wünschenswert, wenn MAP-infizierte Tiere möglichst früh identifiziert und aus der betroffenen Herde genommen werden, beispielsweise bei weiblichen Rindern vor ihrer ersten Besamung (ca. 15. Lebensmonat) bzw. bei MAP-infizierten männlichen Tieren vor ihrer Aufnahme in das Zuchtbullenprüfprogramm.

Optimierung der DFZM-Ak-Tests

In den DFZM-Ak-Tests wurden intakte MAP-Bakterien als Testantigen verwendet, wodurch die gesamte, bakterielle Zelloberfläche zur Bindung MAP-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Gemeinsame Epitope der Mykobakterien können jedoch zu Kreuzreaktionen führen und somit falsch-positive Reaktionen im Testsystem erzeugen (Cousins *et al.*, 1999; Roussel *et al.*, 2007). Deshalb stand zunächst die Frage im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation, ob sich die Adsorption der Serumproben mit MP- oder MAA-Antigen gegenüber dem Verzicht auf eine derartige Vorbehandlung günstiger auf dessen Sensitivität und Spezifität auswirkt. Die Untersuchung, die an Serumproben von Rindern mit klar definiertem MAP-Status vorgenommen wurde, zeigte, dass die Präadsorption mit MP- oder MAA-Antigen die Spezifität der Tests verbesserte. So wurde die Spezifität des DFZM-IgG₁-Tests durch die MP-Präadsorption bei einer 94,4 %igen Sensitivität von 72,7 % (ohne Präadsorption) auf 86,4 % erhöht. Auch die MAA-Präadsorption hatte einen günstigen Effekt (Erhöhung der Spezifität von 86,4 % auf 95,5 % bei einer Sensitivität von 88,9 %). Bei gerade 100 %iger Sensitivität waren der DFZM-IgG- und der DFZM-IgG₁-Test ebenfalls spezifischer, wenn die Serumproben zuvor mit MP-Antigen adsorbiert worden waren als mit MAA-Antigen.

Über ähnliche Beobachtungen wurde bereits früher berichtet. So reagierten sowohl mehr MAP-positive Rinder als auch mehr *M. bovis*-positive Rinder im MAP-ELISA positiv, wenn ihre Serumproben zuvor mit MP-Ganzzelllysate und nicht mit MAA-Antigen adsorbiert worden waren (Yokomizo *et al.*, 1985). In der Dissertation von P.L. Monti (2006) führte die MAA-Präadsorption der Serumproben von MAP-positiven Rindern sogar „zu einem vollständigen Verlust der Reaktivität“, wenn die Serumproben anschließend im Pourquier®- oder Svanovir®-ELISA untersucht wurden. Die im Vergleich zur MAA-Antigen bessere Wirksamkeit von MP-Antigen als Präadsorbens könnte auf die enge Verwandtschaft zwischen MAP und MAA zurückzuführen sein. Die Nukleotidsequenzen der in MAP und MAA vorkommenden Gene sind zu 95 % homolog (Li *et al.*, 2005; Eckstein *et al.*, 2006). Die Präadsorption mit MAA könnte somit zur Folge haben, dass der größte Anteil der gegen MAP gerichteten Antikörper bereits abgefangen wurde und die Menge der nicht-adsorbierten, MAP-spezifischen Antikörper zu gering ist, um eine ausreichend starke Reaktion in den DFZM-Ak-Tests hervorzurufen.

Inwieweit Kühe, die mit MAA infiziert sind bzw. MAA-induzierte Antikörper haben, in den DFZM-Ak-Tests serologisch positiv reagieren, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Dass Antikörper gegen MAA in serologischen Diagnostika für MAP-Infektionen falsch-positive Reaktionen auslösen können, zeigte jedoch eine Studie von Osterstock *et al.* (2007). Hier reagierten 2 Kälber, welchen einmalig abgetötete MAA-Bakterien subkutan injiziert worden waren, über den anschließenden, 10-wöchigen Untersuchungszeitraum in den kommerziellen ELISAs HerdChek® und ParaChek® mehrmals serologisch positiv. Cousins *et al.* (1999) sowie Roussel *et al.* (2007) vermuteten, dass Infektionen mit in der Umgebung der Tiere vorkommenden Mykobakterien häufig zu falsch-positiven Ergebnissen in einem serologischen Test auf MAP führen können. So war das Auftreten von falsch-positiven ELISA-Ergebnissen in einer Rinderherde mit der fäkalen Ausscheidung von Mykobakterien positiv korreliert, die auch in der Umwelt verbreitet sind, wie MAA, *M. asiaticum*, *M. celatum*, *M. gordona*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. scrofulaceum* und der *M. terrae*-Komplex (Roussel *et al.*, 2007). Infektionen mit MAA können bei Schweinen, Katzen, Hunden und Pferden Erkrankungen mit unterschiedlichen Krankheitsbildern verursachen (Lofstedt und Jakowski, 1989; Jordan *et al.*, 1994; Horn *et al.*, 2000). Bei Rothirschen konnte MAA *post mortem* in Darmlymphknoten von 10 der 14 an Diarrhoe erkrankten Tieren molekularbiologisch nachgewiesen werden (Glawischig *et al.*, 2006). Nach Einschätzung einiger Autoren verläuft die Infektion mit MAA beim Rind symptomlos (Cobb und Frothingham, 1999; Olsen *et al.*, 2000). Studien zur Prävalenz von MAA-Infektionen beim Rind sind in der Literatur nicht

vorhanden, weshalb das Risiko von MAA-bedingten falsch-positiven Reaktionen in serologischen Tests auf MAP-Infektionen gegenwärtig nicht einzuschätzen ist. Immerhin konnte die Testqualität der DFZM-Ak-Tests in der vorliegenden Studie durch die Präadsorption verbessert werden. Aufgrund der höheren Spezifität und Sensitivität, die mit der MP-Präadsorption erzielt wurde, wurde diese in den folgenden Untersuchungen der MAA-Präadsorption vorgezogen. Eine Aussage, ob die DFZM-Ak-Tests zwischen MAP- und MAA-infizierten Tieren unterscheiden können, kann zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden.

Weitere Versuche zur Optimierung der DFZM-Ak-Tests konzentrierten sich auf die Wachstumsphase, in der die MAP-Bakterien geerntet wurden, um sie als antigene Testpartikel in den Tests einzusetzen. Dabei wurde eine bessere Unterscheidung zwischen einer MAP-negativen und einer MAP-positiven Serumprobe erzielt, wenn MAP-Bakterien aus der mittleren Log-Phase der Vermehrung verwendet wurden, als wenn sie einer Kultur der frühen Log-Phase oder der stationären Phase entstammten. Dies lässt vermuten, dass MAP-spezifische zellständige Immunogene in der späteren Wachstumsphase vermehrt exprimiert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Shin *et al.* (2008). Bei ihnen reagierten Serumproben MAP-infizierter Tiere mit Filtraten aus MAP-Kulturen der frühen bis mittleren Log-Phase stärker als mit Kulturfiltraten der stationären Phase. Für *M. tuberculosis* konnte mittels Proteomanalyse gezeigt werden, dass der Erreger in der Log-Phase des Wachstums andere Proteine bildete als in der stationären Phase (Yuan *et al.*, 1996; Hu und Coates, 1999; Pfeiffer *et al.*, 2002). So wurden zum Beispiel die Antigene des 85-Komplexes, Hitzeschockproteine (alpha-Kristallin und 65 kDa-Protein) sowie das Enzym Alanindehydrogenase in der Log-Phase verstärkt exprimiert. In der Fachliteratur sind noch keine Berichte über das Proteom von MAP in den verschiedenen Phasen der Vermehrung *in vitro* zu finden. Allerdings zeigte die vergleichende Proteomanalyse eines MAP-Stammes, welcher einmal *in vitro* angezüchtet und einmal direkt aus dem Darm klinisch erkrankter Tiere isoliert worden war, dass bestimmte Proteine reguliert exprimiert werden (Hughes *et al.*, 2007; Egan *et al.*, 2008). Hughes *et al.* (2007) identifizierten dabei 10 Proteine, welche von dem aus dem Ileum eines Paratuberkulose-kranken Schafes isolierten MAP-Stammes *in vivo* exprimiert wurden, nicht aber, wenn dieser in Middlebrook (MB) 7H9-Medium angezüchtet wurde. Auf ähnliche Weise gelang es Weigoldt *et al.* (2011), 4 Membran-assoziierte Proteine zu identifizieren, welche von MAP nur *in vivo* exprimiert wurden. Andere Untersuchungen belegen, dass Anzuchtbedingungen wie Eisenkonzentration, die Temperatur, der pH-Wert oder oxidativer Stress die Proteinexpression von MAP *in vitro* beeinflussen (Lambrecht und Collins, 1992; Gumber *et al.*, 2009; Gumber *et al.*, 2009; Janagama *et al.*, 2009; Kawaji *et al.*, 2012). Gumber *et al.*

(2009) identifizierten 55 Proteine, die MAP bei Nährstoffmangel und Hypoxie vermehrt bildet. Darunter fielen u.a. Antioxidantien, Oxidoreduktasen und Proteine, die am Aminosäurestoff- und Fettstoffwechsel sowie an der Zellwand- und der Proteinsynthese beteiligt sind. Somit könnte der gerade in einer späteren Wachstumsphase von MAP vermutlich vorherrschende Nährstoff- und Sauerstoffmangel dazu führen, dass der Erreger bestimmte und für ihn spezifische Immunogene in stärkerem Maße bildet. Deshalb wären gerade im Hinblick auf eine mögliche Verbesserung der serologischen MAP-Diagnostik weitere Untersuchungen wünschenswert, um derartigen Immunogenen nachzuspüren.

Eda *et al.* (2005) züchteten die in ihrem DFZM-Ak-Test als Testantigen verwendeten Mykobakterien in MB 7H9-Medium an und setzten diese ohne Vorbehandlung direkt im Durchflusszytometer ein. Für ein kommerzielles Testverfahren wäre die Gewinnung der Antigene aus statischen MAP-Suspensionen bei Betrachtung des extrem langsamen Wachstums von MAP aufwändiger und in Bezug auf die Wachstumsphase vermutlich schwierig zu standardisieren. Im Rahmen der hier geschilderten Arbeit wurde dieser Frage nicht nachgegangen. Das Problem der Standardisierung wurde dadurch gelöst, dass zur Etablierung der DFZM-Ak-Tests jeweils nur eine einzige Charge der Test- und Präadsorptionsantigene hergestellt wurde, wobei die Bakterien in der mittleren Log-Phase geerntet, portioniert und anschließend bei -70 °C gelagert wurden. Auf diese Weise sollte eine gleichbleibende Qualität der Test- und Präadsorptionsantigene für die Dauer der Studie gewährleistet gewesen sein.

Evaluierung der DFZM-Ak-Tests an adulten Rindern

Bei der Untersuchung von adulten Rindern im Alter von über 24 Monaten war der DFZM-IgG₁-Test sensitiver als der DFZM-IgG- und der DFZM-IgG₂-Test. Der Nachweis von MAP-spezifischem IgG₂ war wegen der niedrigen Sensitivität sogar ungeeignet. Diese Beobachtungen lassen sich mit den Berichten über die MAP-spezifische humorale Immunantwort in der Fachliteratur in Übereinstimmung bringen. Die als MAP-positiv definierten Rinder schieden alle MAP mit dem Kot aus, wiesen jedoch keine klinischen Symptome auf, so dass sich diese Tiere *per definitionem* im Stadium II der MAP-Infektion befanden. Die Immunantwort beim Rind im Stadium II ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der proinflammatorischen T_H1-Antwort und eine zunehmende T_H2-Antwort (Stabel, 2000a). In *in vitro*-Studien wurde die Wirkung verschiedener T_H1- oder T_H2-assoziiierter Zytokine auf bovine B-Zellen untersucht. Dabei begünstigten die typischen T_H1-assoziierten Zytokine IFN-γ und IL-2 vor allem die Synthese von IgM und IgG₂ (Estes *et al.*, 1994; 1995). Die T_H2-assoziierten

Zytokine IL-4 und IL-13 fördern dagegen *in vitro* einen Antikörper-Switch von IgM zu IgG₁ und IgE (Trigona *et al.*, 1999; Estes und Brown, 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen also, dass bei adulten MAP-Ausscheidern vor allem das mit einer T_H2-Antwort-assoziierte MAP-spezifische IgG₁ gebildet wird. Dass nur bei 8 der 18 MAP-Ausscheider MAP-spezifisches IgG₂ nachgewiesen werden konnte, lässt vermuten, dass sich diese Kühe bereits am Ende des Stadiums II befanden, in welchem die T_H1-Antwort zunehmend schwächer wird. Insofern unterstützt diese Arbeit die Vorstellung, dass Rinder im Laufe der langen Inkubationszeit der Paratuberkulose eine zunehmend kräftigere T_H2-Antwort ausbilden. Auf die selektive Untersuchung von MAP-spezifischem IgM wurde bei adulten Tieren in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da IgM allenfalls mit einer T_H1-Antwort assoziiert ist und bei klinisch inapparent infizierten Rindern nur eine untergeordnete Rolle spielt (Koets *et al.*, 2001). Außerdem gab es bei der ELISA-gestützten Suche nach MAP-spezifischem IgM in anderen Untersuchungen mehr falsch-positive Ergebnisse als bei der Suche von MAP-spezifischem IgG₁. IgM scheint somit nicht geeignet zu sein, um MAP-Ausscheider unter adulten Rindern ausfindig zu machen (Yokomizo *et al.*, 1983; Abbas und Riemann, 1988). Eine mögliche Ursache für die niedrige Spezifität könnte darin begründet sein, dass IgM in der sezernierten Form als Pentamer vorliegt und somit unspezifische Bindungen verstärkt werden.

Im Vergleich zu 3 kommerziellen ELISAs war der DFZM-IgG₁-Test bei einer Spezifität von gerade 100 % mit 77,8 % sensitiver. Bei der Verwendung der vom Hersteller angegebenen Cut Off-Werte wurde für die kommerziellen ELISAs eine Sensitivität von 61,1 % (Pourquier®-ELISAs) bzw. 27,8 % (Cattletype®-ELISA und Svanovir®-ELISA) bei 100 % Spezifität erreicht. Daten aus der Literatur sind aber nur dann vergleichbar, wenn die serologischen Resultate an derselben Goldstandardmethode (hier: Befunde der kulturell-bakteriologischen Kotuntersuchung) bewertet wurden. Streng genommen sind sie auch nur dann vergleichbar, wenn Rinder in demselben Stadium der MAP-Infektion untersucht wurden. Letzteres lässt sich allerdings nur in wenigen Arbeiten nachvollziehen. Veröffentlichte Studien zur Sensitivität und Spezifität des seit Ende 2008 in Deutschland zugelassenen Cattletype®-ELISAs liegen bisher nicht vor. Die Qualitätsparameter des seit Ende 2008 nicht mehr erhältlichen Svanovir®-ELISAs waren in der Untersuchung an 834 MAP-Ausscheidern und 36 MAP-negativen Rindern mit einer Sensitivität von 27,7 % bei einer Spezifität von 90,1 % (McKenna *et al.*, 2005) ähnlich gut wie in der vorliegenden Studie. Dagegen war der Svanovir®-ELISA in den Untersuchungen von Köhler *et al.* (2008) mit 70,0 % deutlich sensitiver und mit 76,6 % aber auch deutlich weniger spezifisch [110 Kühe mit fäkaler MAP-Ausscheidung (kulturell-bakteriologisch)

und/oder pathomorphologischen Veränderungen) und 286 Kühe aus MAP-unverdächtigen Betrieben]. Dagegen waren die für den Pourquier[®]-ELISA ermittelten Werte in der gleichen Studie ähnlich hoch (Sensitivität 53,6 %, Spezifität 99,3 %). Der Pourquier[®]-ELISA erzielte mit 72 % bei 90,2 %iger Spezifität gemäß Fachliteratur auch den bisher höchsten Wert für die Sensitivität. Die untersuchte Tierzahl war allerdings recht klein [18 kulturell-bakteriologisch (Kot) negative und 48 MAP-positive Rinder] (Leroy *et al.*, 2009). In drei Studien war der Pourquier[®]-ELISA aber deutlich weniger sensitiv als in der vorliegenden Studie (Collins *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008). So erreichte der Pourquier[®]-ELISA bei den Untersuchungen von Collins *et al.* (2005) nur eine Sensitivität von 30,0 % bei einer Spezifität von gerade 100 % (359 MAP-negative, 415 MAP-positive Rinder). Fry *et al.* (2008) und Shin *et al.* (2008) errechneten eine Sensitivität von 37,7 % bei einer 99,0 %igen Spezifität (345 MAP-negative, 53 MAP-positive Rinder) bzw. von 28 % bei einer 100 %igen Spezifität (412 Rinder aus einem MAP-freien Betrieb und 444 MAP-positive Rinder). In allen drei Studien dienten die Befunde der kulturell-bakteriologischen Untersuchung von Kotproben auf MAP als Goldstandard. Dass die Sensitivitäten in diesen drei Studien trotz annähernd gleich großer Spezifitäten kleiner waren als in der vorliegenden Untersuchung, könnte zum einen an der Größe der Testpopulation liegen. In der vorliegenden Studie wurde mit 18 MAP-positiven und 22 MAP-negativen Rindern eine deutlich kleinere Testpopulation untersucht. Da die Sensitivität eines serologischen Testsystems stark vom MAP-Infektionsstadium, in dem sich das Rind zum Zeitpunkt der Probennahme befindet, abhängt, könnten bereits sehr wenige Tiere im fortgeschrittenen Stadium der MAP-Infektion in einer kleinen Testpopulation hohe Sensitivitätswerte bedingen. Die an größeren Tierzahlen ermittelten Daten sind vermutlich zutreffender. Deshalb sollten die Sensitivität und Spezifität des DFZM-IgG₁-Tests in größeren Rindergruppen mit möglichst klar definiertem MAP-Status validiert werden, um stärker belastbare Aussagen über seine Qualitäten tätigen zu können.

Im direkten Vergleich zu 3 kommerziellen ELISAs war der DFZM-IgG₁-Test an der Testpopulation von 40 Kühen jedoch deutlich sensitiver und spezifischer und könnte deshalb das Screening von Rinderherden auf MAP-spezifische Antikörper verbessern. Ein flächendeckender Einsatz des neuen Tests ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber eher unwahrscheinlich, da nur wenige Speziallabors mit einem Durchflussszytometer ausgestattet sind und die Probenbearbeitung in diesem System noch nicht automatisiert ist.

MAP-Status der Herkunftsbetriebe von Versuchstieren

Die Identifizierung MAP-unverdächtiger Betriebe stellte in der vorliegenden Arbeit eine große Herausforderung dar. Die unzweifelhafte Klassifizierung als MAP-unverdächtig war eine wichtige Voraussetzung, um MAP-freie, neugeborene Kälber für die experimentelle Infektionsstudie zu rekrutieren. Des Weiteren sollten Serumproben von Rindern in MAP-unverdächtigen Betrieben bei der Evaluierung der DFZM-Ak-Tests an adulten Rindern und an Junggrindern im Feld als negative Kontrollseren dienen.

Keiner der 8 vorberichtlich negativen Rinderbetriebe war im Svanovir[®]-ELISA komplett negativ. Der Anteil der Svanovir[®]-positiven und -fraglichen Rinder pro Betrieb schwankte zwischen 2,4 % und 24,5 % (Mittelwert 15,1 %; Median 16,7 %). Bei der Untersuchung der Svanovir[®]-positiven und -fraglichen Rinder im Pourquier[®]-ELISA wurden in 2 der 8 Betriebe positive Reagenten identifiziert. Die Zahl der MAP-unverdächtigen Betriebe reduzierte sich auf 4 nachdem das IFTN in Gießen durch die kulturell-bakteriologische oder molekularbiologische Kotuntersuchung in 2 Betrieben MAP-Ausscheider ermittelt hatte.

Das Ergebnis, dass ein hoher Prozentsatz der Betriebe mindestens ein serologisch MAP-positives Rind aufwies, war aufgrund der bekanntermaßen hohen Herdenseroprävalenz zu erwarten gewesen. Die Herdenseroprävalenz in Europa wurde in einem aktuellen Review auf über 50 % geschätzt (Nielsen und Toft, 2009). In Deutschland, basierend auf den Daten einiger Bundesländer, lag der Anteil der Herden mit mindestens einem seropositiven Rind zwischen 12 % und 90 % (Böttcher und Gangl, 2004; Hacker *et al.*, 2004). In einer Studie von Böttcher und Gangl (2004) wurde in Deutschland mittels Svanovir[®]-ELISA eine Einzeltierseroprävalenz von 39,4 % festgestellt. Bei der Untersuchung der gleichen Tierpopulation im Pourquier[®]-ELISA reduzierte sich diese Zahl jedoch auf 1,5 %. Der Befund, dass der Anteil an Svanovir[®]-positiven und -fraglichen Kühen in der vorliegenden Arbeit niedriger war als bei Böttcher und Gangl (2004), ist damit zu erklären, dass die Herden bereits vorselektiert worden waren. So wurden nur Betriebe blutserologisch untersucht, in denen bisher keine klinischen Paratuberkulosefälle und/oder keine kulturell-bakteriologisch bestätigte MAP-Infektionen bekannt waren. Eine Angabe zur Einzeltierseroprävalenz kann basierend auf den Ergebnissen des Pourquier[®]-ELISAs in dieser Arbeit nicht gemacht werden, da nur Svanovir[®]-positive und -fragliche Rinder im Pourquier[®]-ELISA untersucht wurden. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass auch hier, dass wie in der Studie von Böttcher und Gangl (2004), im Pourquier[®]-ELISA deutlich weniger Tiere serologisch positiv reagierten. In Betrieb 5 reagierten 4 der 10 (20 %) und in Betrieb 6 2 der 12 (8,3 %) Svanovir[®]-positiven und -fraglichen Kühe im Pourquier[®]-ELISA positiv. Der Anteil der Svanovir[®]-positiven und -fraglichen Rinder,

die im Pourquier®-ELISA positiv reagiert haben, schwankte somit zwischen 0 % und 20 % (Median 0 %, Mittelwert 3,5 %). Neben der hohen Herdenprävalenz stellte bei der Identifizierung von MAP-unverdächtigen Betrieben die niedrige Sensitivität und/oder Spezifität der serologischen Testsysteme ein weiteres Problem dar (Nielsen und Toft, 2008). Die kulturell-bakteriologische Untersuchung war aufgrund des hohen Zeitbedarfs und der erheblichen Kosten für ein Screening der Herden ungeeignet. Um die Sensitivität und Spezifität der serologischen Paratuberkulose-Diagnostik zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene ELISAs miteinander kombiniert. Diese Vorgehensweise wurde inspiriert von der sogenannten sequentiellen MAP-Serologie (SMAPS) (Böttcher und Gangl, 2004; Gangl *et al.*, 2009). In diesem Verfahren werden im ersten Schritt alle Serumproben mit einem sensitiven Screening-ELISA geprüft und alle dabei testpositiven Proben im zweiten Schritt mit einem ELISA höherer Spezifität überprüft. In der vorliegenden Studie wurden der Svanovir®-ELISA als Screening-Methode und der Pourquier®-ELISA als Bestätigungstest eingesetzt.

Trotz des betriebenen Aufwandes, um MAP-unverdächtige Betriebe zu identifizieren, konnte auch in dieser Arbeit nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass einzelne Tiere bereits zu Beginn mit MAP infiziert waren oder sich im Laufe der mehrmonatigen Untersuchungen mit MAP infizierten. Anlass für diese kritische Einschätzung bot unter anderem das Ergebnis der Zweituntersuchung. Da in der experimentellen Infektionsstudie mit der Infektionsgruppe erst 10 Monate nach der Kontrollgruppe begonnen werden konnte, wurde der MAP-Status der MAP-unverdächtigen Betriebe ein bis eineinhalb Jahre nach der Erstuntersuchung erneut überprüft. Im Gegensatz zu der Erstuntersuchung reagierten bei der Zweituntersuchung in einem der 4 zuvor MAP-unverdächtigen Betriebe (Betrieb 2) ein Rind im Alter von über 24 Monaten Pourquier®-fraglich und ein weiteres Rind in diesem Alter Pourquier®-positiv. Mittels Anzuchtverfahren oder PCR war MAP allerdings bei keinem der beiden Rinder im Kot nachweisbar. Betrieb 1 wurde auch nach der Zweituntersuchung zunächst als MAP-unverdächtig eingestuft. Dennoch konnte bei einem Versuchskalb (Kalb 9) aus diesem Betrieb am 9. Lebenstag MAP im Kot mittels PCR und Kultur nachgewiesen werden. Gerade Betrieb 1 wies mit 2,4 % den niedrigsten Anteil an Svanovir®-positiven Rindern auf. Bei Betrieb 3 kamen Zweifel am MAP-Status im Rahmen der Kohortenstudie 2 auf, denn von den 10 untersuchten Jungrindern reagierten 3 Tiere an mindestens einem Beprobungszeitpunkt im DFZM-IgG-Test positiv. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass derzeit nicht mit letzter Sicherheit festgestellt werden kann, ob eine Herde MAP-negativ ist. Noch häufigere blutserologische sowie kulturell-bakteriologische Untersuchung hätten möglicherweise den MAP-Status besser absichern können, waren jedoch aufgrund der

damit verbundenen höheren Kosten und des größeren Zeitaufwandes bei diesem Projekt nicht realisierbar.

Nachweis MAP-spezifischer Antikörper bei experimentell infizierten Kälbern

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand eine kontrollierte Longitudinalstudie zur Dynamik der humoralen Immunantwort gegen MAP bei Kälbern. Hierbei wurden definierte Bakterienmengen eines MAP-Stammes in der zweiten Lebenswoche oral in die Versuchskälber inokuliert. Mit der gewählten Versuchsanordnung gelang es, eine MAP-Infektion bei allen 6 Versuchskälbern zu setzen und eine Serokonversion bei 2 Kälbern mittels DFZM-IgG- bzw. DFZM-IgG₁-Test ab der 44. bzw. 46. W.p.i. nachzuweisen. Ein Kalb begann in der 50. und 52. W.p.i. im Pourquier®-ELISA fraglich zu reagieren.

Das hier verwendete Infektionsmodell wurde in Anlehnung an die Erfahrungsberichte verschiedener anderer Untersucher konzipiert und durchgeführt (Saxegaard, 1990; McDonald *et al.*, 1999; Waters *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2004; Stabel *et al.*, 2003; Koets *et al.*, 2006; Hines *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2007). So wurde der o.g. frühe Infektionszeitpunkt gewählt, da man heute davon ausgeht, dass sich Rinder unter Feldbedingungen meist in den ersten Lebenswochen mit MAP infizieren (Streeter *et al.*, 1995). Die Ansteckung erfolgt meist infolge einer fäkal-oralen Erregerübertragung, die von älteren Erregerauscheidern ausgeht (Clarke, 1997). Die intra-uterine Infektion stellt einen weiteren wichtigen Infektionsweg dar, ist aber von nachrangiger Bedeutung (Whittington und Windsor, 2007). Adulte Rinder sollen eine gewisse Altersresistenz besitzen und sich nicht mehr oder kaum noch mit MAP infizieren können (Clarke, 1997). Um den natürlichen Infektionsweg möglichst getreu nachzuahmen, wurde in den hier beschriebenen Versuchen außerdem auch die orale Inokulation über den Milchaustauscher gewählt. Ferner sollte gewährleistet sein, dass die orale Inokulation des MAP-Stammes möglichst bei allen Versuchskälbern zur persistierenden Infektion führt. Deshalb wurde auch bezüglich des verwendeten MAP-Stammes und der Inokulationsdosis auf publizierte Erkenntnisse zurückgegriffen und der MAP-Stamm K10 an die Kälber verabreicht. K10 ist ein gut charakterisierter MAP-Referenzstamm, der aus dem Kot eines an Paratuberkulose erkrankten Rindes stammt und dessen Genom bereits komplett sequenziert wurde (Li *et al.*, 2005). MAP K10 ist bereits in mindestens 4 publizierten tierexperimentellen Studien am Rind als Infektionsstamm eingesetzt worden und führte dort zur erfolgreichen Infektion der Versuchskälber (**Tabelle 21**). In anderen Untersuchungen wurde zur Instillation des Infektionsstammes auch MAP-haltiges Darmgewebe, das von Paratuberkulose-kranken Rindern

stammte, eingesetzt. Diese Vorgehensweise führte dazu, dass die Infektion bei einem höheren Prozentsatz der inokulierten Kälber anging und ein größerer Anteil der Kälber immunologisch gegen MAP reagierte, als wenn zuvor *in vitro* angezüchtete MAP-Bakterien verabreicht wurden (McDonald *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2007). Nachteilig erschien jedoch, dass definiert MAP-haltiges Organmaterial oder erregerehaltiger Kot nur begrenzt zur Verfügung stehen, schlecht aufzubewahren und vor allem in Bezug auf die Erregermenge schwierig zu standardisieren sind. Diese Überlegungen gaben den Ausschlag, warum für die hier beschriebenen Versuche Kulturmateriel des MAP-Stammes K10 eingesetzt wurde.

Bei der Vorbereitung der Inokula wurde der Standardisierung der zu verabreichenden Erregerzahl besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei erwies sich die LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse, welche erstmals im Rahmen dieser Doktorarbeit für MAP etabliert wurde, als wertvoll, um erheblich schneller als mit der kulturellen KbE-Bestimmung und ebenso zuverlässig die Anzahl „lebender“ und „toter“ Bakterien in einer Suspension zu bestimmen. Während die fragliche Analyse mit dem LIVE/DEAD® BacLight™-Kit bei geringem methodischem Aufwand schon innerhalb einer Stunde gelingt, kann mit dem kulturellen Verfahren wegen des extrem langsamen Wachstums von MAP frühestens nach einer Inkubationszeit von 6 bis 10 Wochen die Anzahl der MAP-Kolonien ausgezählt und die MAP-Keimzahl errechnet werden (Lambrecht *et al.*, 1988). Deshalb ist bei einer experimentellen Infektionsstudie anhand der KbE-Bestimmung nur retrospektiv eine Aussage über die tatsächlich verabreichte Erregerzahl möglich. Außerdem neigt MAP zur Klumpenbildung, so dass die KbE-Bestimmung dazu verleiten kann, die Anzahl der vermehrungsfähigen Bakterien zu unterschätzen (Merkal, 1973). Dies scheint in den hier beschriebenen Untersuchungen aber keine Rolle gespielt zu haben, denn die Ergebnisse der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse korrelierten gut mit den Resultaten der KbE-Bestimmung. Auch wurde mittels LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse eine geringere Erregerdosis (5×10^8 „lebende“ MAP-Bakterien) ermittelt und nicht mit der KbE-Bestimmung (1×10^9 KbE). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass die mit dem LIVE/DEAD® BacLight™-Kit als „tot“ identifizierten MAP-Bakterien tatsächlich nur eine beschädigte Zellmembran aufwiesen und noch vermehrungsfähig waren, sodass sie sich während der Anzucht wieder erholen konnten (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000). Andere Methoden zur Quantifizierung der MAP-Mengen wie die mikroskopische Zählung, die quantitative Real-Time-PCR, die Messung der optische Dichte oder die Bestimmung der Bakterienfeuchtgewichte beziehen sich auf die Gesamtzahl der Bakterien und ermöglichen noch viel weniger die Unterscheidung zwischen nicht-infektiösen („toten“) und infektiösen („lebenden“) Bakterien, weshalb mit ihnen die tatsächlich verabreichte

Anzahl lebender Bakterien eher überschätzt wird (Larsen *et al.*, 1978; Lepper *et al.*, 1989; O'Mahony und Hill, 2002; Sweeney *et al.*, 2006). Die hier etablierte LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse stellt deshalb eine praktikable und, wie die Ergebnisse zeigen, zuverlässige Alternativmethode dar.

Obwohl mehrere Testmethoden eingesetzt und verschiedene Immunglobulin- klassen und -subtypen abgeprüft wurden, konnten humorale Immunreaktionen gegen MAP dennoch nur bei insgesamt 2 von 5 Kälbern beobachtet werden, wobei diese Reaktionen auch erst gegen Ende des Beobachtungszeitraumes auftraten. Bei der Suche nach Ursachen für die fehlende bzw. erst sehr spät einsetzende Immunreaktion stellt sich zunächst die Frage, ob die verwendete Inokulationsdosis hinreichend war, um einerseits tatsächlich eine persistierende MAP-Infektion zu setzen und andererseits auch messbare Immunreaktionen anzustoßen. Experimentelle Belege für die Abhängigkeit der humoralen Immunantwort von der Menge an applizierten MAP-Bakterien, liefern die Befunde eines Versuchs, in dem Rotwild-Kälber gruppenweise mit 3 unterschiedlich hohen Dosen an MAP oral infiziert wurden (O'Brien *et al.*, 2006). Kälber, denen die niedrigste Dosis (10^3 KbE) eines MAP-Feldstammes verabreicht worden war, serokonvertierten über den Untersuchungszeitraum von 40 W.p.i. nicht. Bei Tieren, die 10^9 KbE des gleichen MAP-Stammes erhalten hatten, waren die Titer im Mittel schon ab der 13. W.p.i. tendentiell und ab der 19. W.p.i. signifikant erhöht. Die mittlere Dosis von 10^7 KbE führte nur zu einem geringen (nicht signifikanten) Titeranstieg, der sich ab der 13. W.p.i. bemerkbar machte. Ergebnisse experimenteller Studien zur Dosisabhängigkeit der humoralen Immunantwort beim Kalb wurden bisher nicht publiziert. Immerhin konnten Sweeney *et al.* (2006) bei Kälbern, welche mit $2,5 \times 10^{10}$ KbE des MAP-Stammes ATCC 700533 inokuliert worden waren, MAP in mehreren Organen und in einer größeren Keimzahl nachweisen, als bei Kälbern, die nur mit $1,5 \times 10^6$ KbE infiziert worden waren. Die in der vorliegenden Arbeit verabreichte Inokulationsdosis von etwa 1×10^9 KbE ist im Vergleich mit anderen Studien eher hoch (**Tabelle 21**). Berücksichtigt man außerdem, dass MAP-infizierte Rinder bis zu 10^8 KbE/g Kot ausscheiden, erscheint die von uns eingesetzte Dosis von 1×10^9 KbE auch praxisrelevant (Cocito *et al.*, 1994). Hinzu kommt, dass der MAP-Stamm K10 bereits in 3 anderen publizierten Studien in geringerer Dosis ($1,6 \times 10^7$ KbE) eine humorale Immunantwort in Kälbern induzieren konnte (Waters *et al.*, 2003; Eda *et al.*, 2005; Bannantine *et al.*, 2008).

Man könnte einwenden, dass jegliches Fehlen von MAP-spezifischen Antikörpern bei 4 von 6 bzw. 3 von 5 Kälbern in der Infektionsgruppe auf das Misslingen zurückzuführen ist, eine MAP-Infektion zu setzen. Dieser Einwand kann aber mit dem kulturell-bakteriologischen und/oder molekularbiologischen Erregernachweis in

verschiedenen Gewebeproben (insbesondere Darmlymphknoten sowie Ileum, Jejunum) entkräftet werden. So war MAP kulturell-bakteriologisch noch am 170. Tag *post infectionem* (T.p.i.) bei allen 6 Kälbern der Infektionsgruppe im Ileocaecallymphknoten und/oder im Jejunallymphknoten nachweisbar. Am Ende des Untersuchungszeitraumes, d.h. ca. 12 Monate nach der Inokulation, konnte MAP immerhin noch bei 4 der 5 zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Kälber mittels Kultur oder PCR in Dünndarmlymphknoten gefunden werden. Hieraus läßt sich schließen, dass der Infektionsversuch mit MAP zunächst bei allen Kälbern erfolgreich war. Der sowohl in der kulturell-bakteriologischen als auch in der molekularbiologischen Untersuchung negative Befund von Kalb 14 könnte darauf hindeuten, dass dieses eine Tier den Erreger irgendwann zwischen dem 170. und dem 362. T.p.i. aus seinem Organismus eliminierte. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch dieses Kalb persistent infiziert blieb, es aber die Erregerzahl zumindest soweit reduziert hatte, dass diese unter die Nachweisgrenzen der Tests fiel. Die Beobachtung, dass manche experimentell mit MAP infizierte Kälber den Erreger eliminieren können, wäre nicht neu. So wurden 5 Kälber in einer anderen Studie mit dem bovinen MAP-Stamm CLIJ623 sowie 5 weitere Kälber mit Darmmukosa einer Paratuberkulose-kranken Kuh oral infiziert. In den folgenden 2 Monaten schieden 8 von diesen Kälbern MAP mindestens einmal mit dem Kot aus. Bei der Sektion 54 Monate später waren Paratuberkulose-typische histopathologische Veränderungen jedoch bei keinem Tier festzustellen und auch der Versuch, MAP aus Darmgewebe (Ileum, Ileocaecalklappe, Caecum, Colon) oder Lymphknoten (Mesenterial- und Ileocaecallymphknoten) anzuzüchten, blieb in allen Fällen erfolglos (Stewart *et al.*, 2007). In der kulturell-bakteriologischen Untersuchung wiesen neben Kalb 14 auch die Kälber 8 und 12 ein negatives Ergebnis auf, obwohl bei ihnen der Nachweis von MAP-DNA mittels PCR gelang. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch in diesen beiden Kälbern vermehrungsfähige Erregerformen bereits eliminiert worden waren und der PCR-Befund nur noch vermehrungsunfähige Erreger oder DNA-Bruchstücke anzeigte. Die Hypothese, dass das frühere Auftreten von MAP in den Gewebeproben mit der gegen Versuchsende beobachteten immunologischen Reaktion assoziiert war, konnte nicht bestätigt werden. Interessanterweise wurde MAP bei 2 der 3 Kälber, welche im DFZM-IgG₁-Test positive bzw. fragliche Ergebnisse zeigten, am Tag der Sektion in der kulturell-bakteriologischen Untersuchung negativ auf MAP getestet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine beginnende Elimination des Erregers mit einem Anstieg der humoralen Immunantwort verbunden ist.

Der wahrscheinlichste Grund, warum bei den inokulierten Kälbern in dieser Arbeit keine oder erst sehr spät MAP-spezifische Antikörper nachzuweisen waren, ist die bei

MAP-Infektionen bekanntermaßen nur sehr langsam einsetzende Immunantwort (Stabel, 2000b). Dabei ist es weniger verwunderlich, dass MAP-spezifisches IgG₁ erst mehrere Monate nach der Inokulation erstmals nachgewiesen werden konnte. Nach derzeitigem Kenntnisstand gelangt MAP nach der oralen Aufnahme in den Dünndarm und passiert dort das Epithel über M-Zellen. Nach der basolateralen Freisetzung aus den M-Zellen wird der Erreger von sub- und intraepithelialen Makrophagen sowie Dendritischen Zellen (DC) phagozytiert und ist in der Lage, intrazellulär in diesen professionellen Fresszellen zu überleben und sich zu vermehren (Tooker *et al.*, 2002). MAP-infizierte bovine Makrophagen sezernieren Zytokine (u.a. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12), welche T-Zellen und weitere Makrophagen aktivieren (Coussens *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2004). Die CD4⁺ T-Zellen, die in der frühen Phase der Infektion aktiviert werden, gehören vorwiegend zu den T_H1-Zellen. Das von diesen Zellen sezernierte proinflammatorische Zytokin IFN- γ wirkt auf die T_H2-Zellen hemmend, so dass im klinisch inapparenten Stadium einer MAP-Infektion beim Rind die T_H1-Antwort dominiert (Snapper und Paul, 1987; Koo *et al.*, 2004). Nach Koets *et al.* (2001) ist die T_H1-Antwort beim Rind mit der Produktion von IgG₂ und IgM assoziiert, während die T_H2-Antwort durch die Bildung von IgG₁ gekennzeichnet ist. Somit hätten wir in der von T_H1-Zellen dominierten Frühphase der MAP-Infektion ohnehin zuerst MAP-spezifisches IgG₂ und/oder IgM erwartet und erst mit dem Wechsel zur T_H2-Dominanz einen Anstieg an MAP-spezifischem IgG₁. Hier ist allerdings einzuschränken, dass diese Zuordnung von Immunglobulinklassen und IgG-Subtypen zu den beiden T-Helferzell-Typen nur auf *in vitro*-Studien beruht, in welchen bovine B-Zellen mit bestimmten T_H1- oder T_H2-assoziierten Zytokinen stimuliert und anschließend die von ihnen gebildeten Immunglobulin-(sub)-typen bestimmt wurden (Estes *et al.*, 1994; Estes *et al.*, 1995; Estes und Brown, 2002). Die Hemmung der T_H2-Zellen in der frühen Phase der Infektion wäre eine Erklärung dafür, warum in den Versuchskälbern über Monate keine MAP-spezifischen IgG₁-Antikörper nachzuweisen waren. In demselben Sinn könnte eine zunehmende T_H2-Antwort und damit v.a. die vermehrte Bildung von IL-4 (Tizard, 2009) erklären, warum das MAP-spezifische IgG₁ in den Kälbern 8 und 10 nach ca. 10–11 Monaten anstieg. Vermutlich reagierten die anderen Kälber auf die Infektion langsamer, weshalb der Titeranstieg bei ihnen im Rahmen der auf ca. ein Jahr befristeten Beobachtungsphase gerade nicht mehr erfasst werden konnte.

Die gezielte Suche nach MAP-spezifischem IgG₂ und IgM führte entgegen der Hoffnungen nicht zu einer Steigerung der Sensitivität des DFZM-basierten Tests in der Frühphase der Infektion. Insbesondere war ein Anstieg des IgM-Titers erwartet worden, da diese Immunglobulinklasse hauptsächlich bei der immunologischen Primärantwort gebildet wird. Vielmehr war ein Titeranstieg bei IgG₂ oder IgM im gesamten

Versuchszeitraum sogar bei keinem einzigen Kalb feststellbar. Studien, die die Dynamik MAP-spezifischer Immunglobuline beim Kalb differenziert nach IgG₁, IgG₂ und IgM analysierten, liegen nicht vor, weshalb diese Befunde mit anderen nicht zu vergleichen sind. Vermutlich werden im frühen Stadium der MAP-Infektion nur wenige Antikörper gebildet, sodass ihre Serumspiegel unter der Nachweisgrenze der gegenwärtig verfügbaren Testsysteme liegen.

Dass in der frühen Phase der MAP-Infektion eine T_H1-Antwort dominiert, wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen durch die gesteigerte Produktion von T_H1-assoziierten Zytokinen wie IFN- γ , IL-2 und TNF- α in natürlichen mit MAP infizierten Rindern (klinisch inapparentes Stadium) oder in experimentell mit MAP-infizierten Kälbern belegt (Stabel, 2000a; Stabel *et al.*, 2003; Uzonna *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Khalifeh und Stabel, 2004; Wu *et al.*, 2007). Waters *et al.* (2003) zeigten, dass im frühen Stadium der MAP-Infektion (ab dem 7. Tag p.i.) vorwiegend CD4⁺-Zellen die Quelle von IFN- γ darstellen. Nach der *ex vivo*-Stimulation von PBMC aus 3 MAP-infizierten Kälbern mit MAP-Ganzellysat, konnte ein signifikanter Anstieg des IFN- γ in CD4⁺-Zellen aber auch noch 194 Tage p.i. festgestellt werden. Stabel *et al.* (2003) konnten nach Stimulation der PBMC, welche aus experimentell mit MAP infizierten Kälbern isoliert worden war, mit MAP-Antigen schon ab dem 2. Monat p.i. im Mittel signifikant höhere IFN- γ -Werte nachweisen als bei den mitgeführten Kontrollkälbern. Wu *et al.* (2007) untersuchten mittels RT-PCR die Zytokinexpression in Mesenteriallymphknoten von experimentell mit MAP infizierten Kälbern. Ein kontinuierlicher Anstieg der Transkription von IFN- γ und TNF- α konnte ab dem 6. Monate p.i bis zum Ende der Studie (9 Monate p.i.) nachgewiesen werden. Dagegen fiel die Transkription von IL-4 in den Mesenteriallymphknoten bis zur Ende der Studie kontinuierlich ab.

Auf die Untersuchung von MAP-spezifischem IgA wurde in der vorliegenden Studie verzichtet, da aufgrund der Datenlage nicht erwartet worden war, dass diese Immunglobulinklasse ein hinreichend sensibler Marker für die MAP-Infektion ist. IgA macht im Serum von Rindern nur 2 % (w/w) der Immunglobuline aus, prozentual größere Anteile besitzt es an den Immunglobulinen im Mukus der Darmschleimhaut (43 %), im Nasensekret (97 %) oder in Tränenflüssigkeit (86 %) (Mach und Pahud, 1971). Selbst bei Rindern, die sich im fortgesetzten Stadium der MAP-Infektion befanden und den Erreger mit dem Kot ausschieden, war MAP-spezifisches IgA nur bei 9 von 20 Tieren (45 %) nachweisbar (Abbas und Riemann, 1988). IgA scheint zumindest in frühen Stadien der MAP-Infektion weder systemisch noch lokal in der Darmschleimhaut in signifikanten Mengen gebildet zu werden. So wurde MAP-spezifisches IgA zumindest in der achtwöchigen Beobachtung nach der oralen

Infektion weder im Serum oder auf der Darmschleimhaut von experimentell mit MAP-infizierten Schaflämmern ($n = 8$) gefunden (Begara-McGorum *et al.*, 1998).

Wenngleich in der vorliegenden Studie mit dem DFZM-IgG- bzw. mit dem DFZM-IgG₁-Test schon ab der 44. bzw. 46. W.p.i. MAP-spezifische Antikörper nachgewiesen wurden und damit früher und häufiger als mit dem Pourquier[®]-ELISA, so gelang das in anderen Studien noch früher. In der vorhandenen Literatur gibt es allerdings nur 4 publizierte Studien, in denen die humorale Immunantwort beim Kalb nach experimenteller Infektion mit MAP untersucht wurde, und MAP-spezifische Antikörper dabei schon im ersten Lebensjahr auftraten [**Tabelle 21**; (Waters *et al.*, 2003; Eda *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2007; Bannantine *et al.*, 2008)]. So infizierten Stewart *et al.* (2007) 5 Kälber oral mit 8×10^{10} KbE des bovinen MAP-Stammes CLIJ623 sowie 5 weitere Kälber mit Darmmukosa einer Paratuberkulose-kranken Kuh. MAP-spezifische Antikörpertiter stiegen nur bei 2 von 5 CLIJ623-infizierten Kälbern an, und zwar ab dem 8. bzw. 21. Monat p.i.. Bei 3 der 5 Kälber, die über infektiöse Darmmukosa infiziert worden waren, traten erhöhte Antikörpertiter ab dem 9., 20., bzw. 21. Monat p.i. auf. Somit gelang der Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im 8. bzw. 9. Monat p.i. in jener Studie nur geringfügig früher als in der hier präsentierten Untersuchung (10. Monat p.i., entspricht 44. w.p.i.). Gegenwärtig kann nicht ausgeschlossen werden, dass diesen Diskrepanzen von Unterschieden in der Virulenz der verwendeten MAP-Stämme oder in den Empfänglichkeiten der verwendeten Kälber oder der 80-fach höheren Infektionsdosis verursacht wurden. Die 3 anderen Studien, in denen MAP-spezifische Antikörper bei experimentell infizierten Kälbern früher als in der vorliegenden Studie gefunden wurden, beziehen sich alle auf denselben Infektionsversuch einer US-amerikanischen Forschergruppe, die Kälber mit $1,6 \times 10^7$ KbE des MAP-Stammes K10 inokuliert hatten. Mit einem DFZM-basierten Immuntest fanden die Forscher MAP-spezifische Antikörper ab dem 170. T.p.i. (Eda *et al.*, 2005). Im LAM-ELISA war die Serokonversion ab dem 134. T.p.i. (Waters *et al.*, 2003) und in einem Dot-Plot-Array sogar ab dem 70. T.p.i. nachweisbar (Bannantine *et al.*, 2008). Dies ist ca. 137 bis 237 Tage früher als mit den DFZM-IgG-Tests in der hier präsentierten Untersuchung. Es ist aber wenig wahrscheinlich, dass die DFZM-Methode von Eda *et al.* (2005) so deutlich sensitiver gewesen war als der im Grunde gleich aufgebaute DFZM-IgG-Test der vorliegenden Studie, der außerdem durch die Einführung der MP-Präadoption gegenüber der Ausführung von Eda *et al.* verbessert wurde. Plausibler ist die Erklärung, dass die US-amerikanischen Kollegen die Serokonversion deswegen früher feststellten, weil sie die MAP-Bakterien nicht oral in die Kälber inokuliert hatten, sondern per Injektion direkt in die Tonsillen. Wahrscheinlich sind die MAP-Bakterien auf diese Weise schneller und in größerer Zahl mit den Zellen des Immunsystems in

Kontakt gekommen als bei der oralen Verabreichung (Waters *et al.*, 2003). Hinsichtlich des auf dem Testantigen LAM basierenden ELISA ist zunächst festzustellen, dass er gemäß Literatur im Vergleich zu anderen ELISA-Systemen tatsächlich sehr sensitiv ist (Sugden *et al.*, 1987; Jark *et al.*, 1997). Andererseits ist er zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper aber auch weniger spezifisch, da auch andere Mykobakterien wie z.B. *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. smegmatis* und *M. fortuitum* sehr ähnlich strukturierte LAMs bilden (McNab *et al.*, 1991; Khoo *et al.*, 2001). Waters *et al.* (2003) machen zur Spezifität des LAM-ELISA in ihren Untersuchungen keine Angaben. Die nachweislich geringe Spezifität des LAM-ELISA ist vermutlich ein Grund, warum der auf LAM-basierende Svanovir®-ELISA in Deutschland Ende 2008 vom Markt genommen wurde. Wie oben beschrieben, gelang Bannantine *et al.* (2008) mittels Dot-Plot-Array der bisher früheste Nachweis einer MAP-spezifischen Sero-konversion (ab dem 70. T.p.i.). Bei den beiden reaktiven Antigenen handelte es sich um die rekombinant hergestellten Proteine MAP1087 und MAP1204, die demnach sehr vielversprechende Kandidaten für neue, bessere Diagnostika sind. Allerdings wiesen nur 5 von 9 adulten MAP-ausscheidenden Rindern (55,5 %) Antikörper gegen diese Proteine auf. Ob sich diese Antigene und die Dot-Plot-Array-Methode auch zur Anwendung im Feld eignen, kann deshalb erst dann bewertet werden, wenn eine größere Anzahl von Kälbern untersucht worden ist und Daten aus einem praxisnäheren Infektionsversuch mit oraler MAP-Inokulation vorliegen.

Tabelle 21: Publierte tierexperimentelle Untersuchungen zur humoralen Immunantwort von Kälbern bei MAP-Infektionen.

Die Tabelle listet nur experimentelle Studien seit 1990 auf.

MAP-Infektionsstamm	Inokulations-dosis	Infektionsweg	Anzahl ¹ / Alter	Studien-dauer	Ak-Nachweis ²	Referenz
Feldstamm*	10x10 mg FG	oral	5 K / 1 Mo	18 Mo	0/5	Saxegaard, 1990
Feldstamm*	3x2 g FG	intragastral	4 K / < 2 Mo	24 Mo	0/4	McDonald <i>et al.</i> , 1999
Feldstamm*	3x20 g DM	intragastral	4 K / < 2 Mo	24 Mo	1/4 ~ 22 M.p.i.	McDonald <i>et al.</i> , 1999
K10	4x(4x10 ⁶) KbE	intra-tonsillär	3 K / 2 Wo	11 Mo	3/3 134 T.p.i.	Waters <i>et al.</i> , 2003
k.A.	7x(1x10 ⁷) KbE	oral	3 K / < 3 T	6 Mo	0/3	Koo <i>et al.</i> , 2004
Feldstamm*	5x(1x10 ⁸) KbE	intra-gastral	6 K / 4 Mo	6 Mo	0/6	Stabel <i>et al.</i> , 2003
Feldstamm*	9x20 g Kot	oral	10 K / < 1 Mo	22 Mo	4/10 406 T.p.i.	Koets <i>et al.</i> , 2006
19698	10x(1x10 ⁸) KbE	oral	5 K / < 3 Wo	4 Mo	0/5	Rosseels <i>et al.</i> , 2006
K10	bis 1x10 ⁸ KbE	Ileum-injektion	5 K / < 3 Wo	9 Mo	0/5	Wu <i>et al.</i> , 2007
K10	4x(4x10 ⁶) KbE	intra-tonsillär	3 K / 2 Wo	11 Mo	3/3 170 T.p.i.	Eda <i>et al.</i> , 2005
CLIJ623 (Rind-Typ)	4x(2x10 ¹⁰) KbE	oral	5 K / 6 Wo	54 Mo	2/5 8 M.p.i.	Stewart <i>et al.</i> , 2007
Feldstamm*	4x(14-20 g) DM	oral	5 K / 6 Wo	54 Mo	3/5 9 Mo	Stewart <i>et al.</i> , 2007
CLIJ361 (Schaf-Typ)	4x(2x10 ¹⁰) KbE	oral	5 K / 14 Wo	35 Mo	1/5 3 M.p.i.	Stewart <i>et al.</i> , 2007
oviner Feldstamm*	4x(14-20 g) DM	oral	5 K / 14 Wo	35 Mo	0/5	Stewart <i>et al.</i> , 2007
K10	4x(4x10 ⁶) KbE	intra-tonsillär	2 K / 2 Wo	11 Mo	2/2 70 T.p.i.	Bannantine <i>et al.</i> , 2008

Fortsetzung der **Tabelle 21** auf der nächsten Seite

Tabelle 21 (Fortsetzung)

Erläuterungen:	¹	Anzahl der Kälber der Infektionsgruppe
	²	Anzahl der Kälber der Infektionsgruppe, in denen ein positiver Nachweis MAP-spezifischer Antikörper im Versuchszeitraum möglich war, sowie frühester Zeitpunkt des Nachweises MAP-spezifischer Antikörper
	*	isoliert aus einer an Paratuberkulose erkrankten Kuh bzw. einem Paratuberkulose-kranken Schaf; in der Publikation sind keine näheren Angaben zum MAP-Stamm enthalten
	DM:	Darmmukosa einer an Paratuberkulose-erkrankten Kuh;
	FG:	Feuchtgewicht;
	K:	Kalb;
	k.A.:	keine Angabe;
	Mo:	Monat;
	M.p.i.:	Monate <i>post infectionem</i>
	T.p.i.:	Tage <i>post infectionem</i>

Überraschenderweise wiesen 3 Kälber der Infektionsgruppe, welche aus den MAP-unverdächtigen Herden akquiriert wurden, initial hohe Antikörpertiterwerte auf. Diese lagen im DFZM-IgG-Test bei 3 Kälbern (11, 12, 14) längstens bis zum 93. Lebenstag und im DFZM-IgG₁-Test bei einem Kalb (Kalb 11) bis zum 65. Lebenstag im positiven Bereich. Kalb 11 reagierte auch im Pourquier®-ELISA in der ersten Untersuchung (9. Lebenstag) serologisch positiv. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Antikörpern um Immunglobuline maternalen Ursprungs gehandelt hat. Auch Eda *et al.* (2005) wiesen mittels DFZM-Methode bei 7 der 8 Kontrollkälber initial hohe Antikörpertiter auf, welche sie auf maternale Antikörper zurückführten. Eine Erklärung für die anfänglich hohen Titer bei den MAP-infizierten Kälbern (Infektionsgruppe) könnte sein, dass sich die Muttertiere trotz des MAP-unverdächtigen Betriebsstatus mit MAP infiziert hatten. Das Muttertier von Kalb 11 stammte aus Betrieb 4, welcher bei der Erstuntersuchung den höchsten Anteil Svanovir®-positiver Tiere (18,9 %) unter den 4 MAP-unverdächtigen Betrieben aufwies. Das Muttertier selbst zeigte im DFZM-IgG-Test ein fragliches Ergebnis. Die Mütter der Kälber 12 und 14 stammten aus dem Betrieb 2, welcher bei der Nachuntersuchung sogar zwei Pourquier®-positive Tiere aufwies. Mit dem DFZM-IgG-, dem DFZM-IgG₁-Test und dem Pourquier®-ELISA waren diese Muttertiere selbst jedoch negativ getestet worden. Dies könnte an dem Zeitpunkt der Probenentnahme liegen, denn die Beprobung dieser Mütter fand 4 bzw. 6 Tage

nach der Geburt statt, weshalb der MAP-spezifische Antikörpertiter noch erniedrigt gewesen sein könnte. Es ist außerdem bekannt, dass die IgG₁-Konzentration im Serum von Kälbern 24 Stunden nach der Geburt im Vergleich zu den Muttertieren doppelt so hoch sein kann, wenn sie hinreichend Kolostrum aufgenommen haben (Molla, 1978; Butler, 1983). Dies könnte erklären, warum das Kalb einer seronegativen Mutter seropositiv reagiert (Molla, 1978; Butler, 1983). Ein weiterer Grund für die initial hohen Titerwerte der o.g. Versuchskälber könnten kreuzreagierende maternale Antikörper sein. Häufig sind es immunologische Reaktionen gegen in der Umgebung vorkommende Mykobakterien oder andere Erreger des *M. avium*-Komplexes, die ein falsch-positives Ergebnis in einem serologischen Testsystem für *M. bovis*- oder MAP-Infektionen erzeugen (Wilks *et al.*, 1981; Cousins *et al.*, 1999; Roussel *et al.*, 2007). Durch die in den DFZM-Ak-Testvarianten durchgeführte Präadsorption der Serumproben mit MP und die Verrechnung von MAA im DFZM-Titer-3 (siehe **Kapitel III 9.2.4**) sollte der Einfluss solcher Kreuzreaktion zwar minimiert werden, dennoch sind sie nicht völlig auszuschließen. Einen dritten Erklärungsansatz für die serologischen Reaktionen der o.g. Kälber zu Beginn des Infektionsversuches bieten sog. „natürliche“ Antikörper. „Natürliche“ Antikörper werden unabhängig von einem Antigenstimulus gebildet und zeichnen sich durch niedrige Avidität und Polyspezifität aus. Dadurch sind sie in der Lage, an ein breites Antigenspektrum zu binden und könnten somit für unspezifische Antikörperbindungen in den ersten Lebenswochen verantwortlich sein (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1992). Insbesondere B1-Zellen werden als Quelle von „natürlichem“ IgM, IgA und IgG im Mensch und in der Maus betrachtet (Galili *et al.*, 1987; Baumgarth *et al.*, 1999; Elluru *et al.*, 2008). B1-Zellen unterscheiden sich unter anderem von B2-Zellen, dass sie überwiegend während der fetalen und neonatalen Phase gebildet werden (Kantor und Herzenberg, 1993; Hardy und Hayakawa, 1994). Untersuchungen zu „natürlichen“ Antikörpern beim Rind sind in der Literatur allerdings nicht vorhanden.

Nachweis MAP-spezifischer Antikörper im Feld

Nachweis MAP-spezifischer maternaler Antikörper bei Kälbern und Jungrindern (Kohortenstudie 1)

Die Plazenta des Rindes ist nach dem Prinzip der synepitheliochorialen Plazenta aufgebaut, welche einen Übergang maternaler Antikörper während der Trächtigkeit verhindert. Deshalb weisen neugeborene Kälber zunächst eine physiologische Hypoglobulinämie auf (Barrington und Parish, 2001; Prado *et al.*, 2006). Zur raschen, passiven Immunisierung muss das Kalb maternale Immunglobuline mit dem Kolostrum aufnehmen. Wenn entsprechende Antikörper im aufgenommenen Kolostrum enthalten

waren, reagieren Kälber in serologischen Tests deshalb für einige Wochen auch dann seropositiv, wenn sie selbst mit dem fraglichen Antigen (noch) gar nicht in Kontakt gekommen sind. Im Laufe von einigen Wochen werden die Immunglobuline maternalen Ursprungs vom Organismus des Kalbes wieder abgebaut. Wie lange sie im Serum nachweisbar sind, hängt von der Halbwertszeit der verschiedenen Immunglobulin-klassen (IgG: 16-32 Tage; IgM: 4 Tage; IgA: 2-3 Tage) sowie von deren Anfangskonzentration im Blut und von der Sensitivität des verwendeten Testsystems ab (Tizard, 2009). MAP-spezifische Immunglobuline, die ein Kalb über das Kolostrum aufgenommen hat, können eine aktive Immunisierung des Kalbes vortäuschen, da maternale Antikörper von den selbst gebildeten Antikörpern in der Routinediagnostik nicht zu unterscheiden sind. Die Kohortenstudie 1 befasste sich deshalb mit der Dynamik von maternalen MAP-spezifischen Antikörpern im Serum von Kälbern während der ersten 6 Lebensmonate. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage, wann diese Antikörper abgebaut sind.

Die 6 untersuchten seropositiven Kälber wiesen sowohl im DFZM-IgG-Test als auch im DFZM-IgG₁-Test bereits nach der Kolostrumaufnahme hohe Titer auf und blieben mindestens bis zum 20. und längstens bis zum 121. Lebenstag serologisch positiv bzw. fraglich. Die IgG₁-Titer sanken etwas schneller ab, sodass diese Titer bei 5 Kälbern bereits ab dem 54. Lebenstag im negativen Bereich lagen und bei einem Kalb erst nach dem 121. Lebenstag. Auch im Pourquier®-ELISA reagierten wenigstens 3 Kälber initial positiv und blieben längstens bis zum 104. Lebenstag seropositiv.

Dass es sich bei den Antikörpern, die initial mit hohem Titer in den Kälberseren nachgewiesen wurden, tatsächlich um Immunglobuline maternalen Ursprungs gehandelt hat, kann nicht direkt bewiesen werden. Es sprechen aber mehrere Indizien dafür:

- Alle Muttertiere der seronegativen Kälber reagierten im DFZM-IgG- und DFZM-IgG₁-Test selbst seronegativ, während 5 der 6 Muttertiere von seropositiven Kälbern im DFZM-IgG-Test seropositiv waren. Nicht ganz in das Bild passt das seropositive Kalb „Feld K14“, da dessen Mutter als seronegativ einzustufen war. Möglicherweise hatte das Kalb „Feld K14“ Kolostrum von einer anderen, seropositiven Kuh erhalten, auch wenn dies der Betriebsleiter ausschloss. Andererseits könnte die Mutter von „Feld K14“ auch falsch-negativ reagiert haben, da sie nur einmal und zwar einen Tag nach der Geburt beprobt wurde. Es ist bekannt, dass bei der Geburt die Anreicherung der Immunglobuline im einschliessenden Kolostrum transient zum Absinken des Immunglobulinspiegels im Blut führt (Butler, 1983). Auch der MAP-spezifische Antikörpertiter kann aus

diesem Grunde bis zum Tag der Geburt auf bis zu 45 % des Ausgangstiters fallen (Stabel und Goff, 2004). Deshalb ist ein negativer serologischer Befund kurz vor oder nach der Geburt mit Zweifeln behaftet.

- Der Titerverlauf über die Zeit entsprach der für maternale Antikörper bekannten Dynamik. So wiesen alle 6 seropositiven Kälber in der ersten Serumprobe nach Kolostrumaufnahme einen hohen MAP-reaktiven Antikörpertiter auf, welcher bei 5 Kälbern sogar den Maximaltiter des gesamten Untersuchungszeitraumes darstellte, der danach kontinuierlich von Beprobungszeitpunkt zu Beprobungszeitpunkt sank. Dies passt zu der Erkenntnis, dass die Fähigkeit des Darmepithels, kolostrale Antikörper aufzunehmen, zeitlich begrenzt ist. Der Darmschrankenschluss („gut closure“) setzt etwa mit der 12. Lebensstunde ein und ist im Durchschnitt in der 24. bis 48. Lebensstunde abgeschlossen. Der Darmschrankenschluss variiert für die verschiedenen Antikörpersubtypen von 21 bis 48 Stunden nach der Geburt für IgG, 16 bis 23 Stunden für IgM und 23 bis 25 Stunden für IgA (Stott *et al.*, 1979; Kim und Schmidt, 1983). Maximale Serumimmunglobulinspiegel werden in neugeborenen Kälbern in der Regel zwischen 12 bis 24 Stunden nach der ersten Kolostrumfütterung festgestellt (Erhard, 1999). Eine Ausnahme stellte der Titerverlauf von Kalb „Feld Kalb 3“ dar, bei welchem der Maximaltiter erst in der zweiten Untersuchung am 22. Tag *post natum* erreicht wurde. Da die Erstbeprobung dieses Kalbes am Tag der Geburt stattfand, war der maximale Serumimmunglobulinspiegel zu diesem Zeitpunkt vermutlich noch nicht erreicht worden. Im übrigen kann durch eine verspätete Kolostrumgabe der Darmschrankenschluss weiter hinaus gezögert werden und somit erst Tage nach der Geburt der maximale Titer im Serum erreicht werden (Stott *et al.*, 1979).
- Bei den seropositiven Kälbern (Mittelwert 136,3 %) wurde ein dreifach höherer MAP-spezifischer Antikörpertiter im DFZM-IgG₁-Test festgestellt als bei den Muttertieren (Mittelwert 42,9 %). Dieser Befund deckt sich mit der publizierten Beobachtung, dass die Gesamt-IgG₁-Konzentration im Serum von Kälbern 24 h nach Kolostrumaufnahme doppelt so hohe Werte wie die IgG₁-Konzentration im Serum adulter Kühe erreicht (Molla, 1978; Butler, 1983).
- Der bei allen seropositiven Kälbern beobachtete Titerabfall steht mit der bekannten Halbwertszeit der Immunglobuline im Einklang. Mit einer Halbwertszeit von 16 bis 32 Tagen ist IgG das am längsten im Blut zirkulierende Immunglobulin (Douglas *et al.*, 1989). Die Halbwertszeit von IgM beträgt ca. 4 Tage, von IgA 2 bis 3 Tage (Husband *et al.*, 1972; Logan *et al.*, 1973). Dabei dauerte es in der vorliegenden Untersuchung umso länger bis die Kälber seronegativ

reagierten, je höher der initiale Antikörpertiter war. Auch zu diese Beobachtung trifft auf maternale Antikörper zu, denn der im Serum gemessene Immunglobulinspiegel eines Kalbes wird positiv von der IgG-Konzentrationen sowie der Menge des aufgenommenen Kolostrums beeinflusst (Morin *et al.*, 1997; Jaster, 2005). Darüberhinaus ist der Immunglobulingehalt des Kolostrums auch von genetischen Faktoren, dem Alter der Kuh bzw. der Anzahl der Abkalbungen sowie der Jahreszeit abhängig (Lambrecht *et al.*, 1982).

- In der Literatur sind bisher keine Studien zur Dynamik MAP-spezifischer maternaler Antikörper beschrieben. Dagegen findet man für Antikörper anderer Spezifität diverse Angaben über den Zeitraum, in dem solche Antikörper im Serum der Kälber vorhanden sind. Wie bereits erwähnt, ist die Nachweisdauer maternaler Antikörper neben der Halbwertszeit der verschiedenen Immunglobulinklassen und deren Anfangskonzentration im Blut auch von der Sensitivität des verwendeten Testsystems abhängig. So wiesen Lemaire *et al.* (2000) in 4 Kälbern nach Kolostrumaufnahme bis zum 8. Lebensmonat BHV-1-Antikörper im Virus-Neutralisationstest nach, wohingegen im ELISA bis zum 10. Lebensmonat positive Resultate erzielt wurden. Ebenfalls maternale BHV-1-Antikörper konnten in einer anderen Studie bis zum 11. Lebensmonat mittels ELISA nachgewiesen werden (Cho *et al.*, 2002). Maternale Blauzungenvirus-Antikörper waren in 22 Kälbern längstens vom 70. bis 173. Lebenstag im kompetitiven ELISA und vom 70. bis zum 113. Tag im Serumneutralisationstest nachweisbar (Vitour *et al.*, 2011).

Der Nachweis maternaler Antikörper kann per definitionem nicht als Beweis einer beim Kalb vorhandenen MAP-Infektion interpretiert werden. Folglich macht es keinen Sinn, mit serologischen Methoden nach den Zeichen einer MAP-Infektion beim Kalb zu suchen, solange die Immunglobuline maternalen Ursprungs im Kalb nicht abgebaut sind. Nach den Ergebnissen der Kohortenstudie 1 wäre der Einsatz der DFZM-Tests oder des Pourquier®-ELISA bei Kälbern zu diesem Zweck frühestens ab einem Lebensalter von ca. 4-5 Monaten zu empfehlen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die DFZM-basierten Tests aber auch dann sehr wertvolle diagnostische Informationen liefern, wenn man sie früher einsetzt. Denn offensichtlich kann man neugeborene Kälber sehr sensitiv als Sentinels für den MAP-Infektionsstatus ihrer Mütter nutzen, wenn die Kälber einige Tage nach der Kolostrumaufnahme mit einem DFZM-Test geprüft werden. Ein positiver Befund beim neugeborenen Kalb könnte im Rahmen der Paratuberkulose-Sanierung eines Betriebs bedeuten, dass die zugehörige Mutter (bzw. die kolostrumspendende Kuh) als MAP-infiziert klassifiziert wird. Da das Kolostrum das wichtigste Vehikel zur Übertragung von MAP von infizierten Kühen auf

die Nachzucht ist, könnte der Nachweis MAP-spezifischer Antikörper in einem neugeborenen Kalb auch dahingehend interpretiert werden, dass es mit hoher Wahrscheinlichkeit MAP-infiziertes Kolostrum aufgenommen hat und demnach ebenfalls als MAP-infiziert einzustufen ist. Es sollte in zukünftigen Forschungsarbeiten genauer untersucht werden, ob sich das im Kalb befindliche, MAP-spezifische IgG oder IgG₁ maternalen Ursprungs als Messparameter für die sensitivere und methodisch einfachere serologische Erkennung von MAP-infizierten Kühe eignet. Dabei müsste dann auch der Einfluss von „natürlichen“ Antikörpern (siehe oben) auf die serologische Befunderhebung abgeklärt werden.

Nachweis der MAP-spezifischen Serokonversion bei Jungrindern (Kohortenstudie 2)

Kommerzielle ELISAs erkennen aufgrund ihrer niedrigen Sensitivität MAP-infizierte Kälber und Jungrinder im Alter von bis zu 2 Jahren kaum und gelten somit für den Nachweis von MAP-Infektionen in der frühen Phase der Infektion als ungeeignet (Juste *et al.*, 2005). Zu den Lebenszeiträumen, in denen es erstmalig zur MAP-spezifischen Serokonversion kommt, gibt es in der Fachliteratur bisher keine konkreten Angaben. Ziel der durchgeführten Kohortenstudie 2 war es deshalb, denjenigen Moment, ab dem MAP-infizierte Jungrinder erstmals spezifisch mit einer Serokonversion reagieren, zeitlich einzugrenzen. Aus finanziellen und organisatorischen Gründen war diese Untersuchung nicht mit einer kontrollierten, experimentellen Infektion zu realisieren. Vielmehr wurden hierzu Kälber bzw. Jungrinder in den hinsichtlich ihres MAP-Status gut charakterisierten Betrieben 3 (MAP-unverdächtig) und 9 (MAP-Problembetrieb) rekrutiert.

Im Endergebnis waren die Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen enttäuschend gering. Immerhin erzielten die Jungrinder des MAP-Problembetriebes in zwei Testzeiträumen durchschnittlich signifikant höhere Titer als Jungrinder des MAP-unverdächtigen Betriebes (17.-18. und im 21.-22. Lebensmonat). Dies war aber nur bei Anwendung des DFZM-IgG-Test zu beobachten. Die Unterschiede waren nicht signifikant, wenn mit dem DFZM-IgG₁-Test gemessen wurde. Auch bei der Einzeltierbetrachtung reagierten im DFZM-IgG-Test mehr Jungrinder serologisch positiv als im DFZM-IgG₁-Test. Genaus andersherum als bei Kälbern im ersten Lebensjahr scheint der DFZM-IgG-Test also bei den Jungrindern im zweiten Lebensjahr sensitiver als der DFZM-IgG₁-Test zu sein. Der früheste Nachweis einer Serokonversion bei den Jungrindern aus dem MAP-Problembetrieb gelang im DFZM-IgG-Test im 10. Lebensmonat. Allerdings reagierten auch 3 von 10 Jungrindern in dem MAP-unverdächtigen Betrieb 3 seropositiv, und zwar bereits ab dem 8. Lebensmonat.

Wie bereits erläutert (siehe auch **Kapitel II 3.3**), können Kreuzreaktionen infolge Kontakt zu anderen Mykobakterien als Ursache für die seropositiven Reaktionen im MAP-unverdächtigen Betrieb nicht ausgeschlossen werden. Häufig sind es immunologische Reaktionen gegen in der Umgebung vorkommende Mykobakterien oder andere Erreger des *M. avium*-Komplexes, die ein falsch-positives Ergebnis in einem serologischen Testsystem für *M. bovis*- oder MAP-Infektionen erzeugen (Wilks *et al.*, 1981; Cousins *et al.*, 1999; Roussel *et al.*, 2007). Durch die in den DFZM-Ak-Testvarianten durchgeführte Präadsorption der Serumproben mit MP und die Verrechnung von MAA im DFZM-Titer-3 wurde versucht, den Einfluss von Kreuzreaktion zu minimieren. Deshalb es wahrscheinlicher, dass die Jungrinder trotz des MAP-unverdächtigen Betriebsstatus doch mit MAP in Kontakt gekommen waren. Gestützt wird diese Vermutung durch den Befund, dass ein Jungrind im MAP-unverdächtigen Betrieb im Pourquier[®]-ELISA immerhin fraglich reagierte. Die Mutter eines dieser Jungrinder erzielte im Pouquier[®]-ELISA sogar ein deutlich positives Resultat (Daten wurden nicht gezeigt). Da der Pourquier[®]-ELISA mit den vom Hersteller angegebenen Cut Off-Werten eine sehr hohe Spezifität von 99 bis 100 % zur Erkennung von MAP-negativen Kühen besitzt (Collins *et al.*, 2005; Fry *et al.*, 2008; Köhler *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008), bestehen begründete Zweifel, ob der MAP-unverdächtige Status des Betriebes 3 tatsächlich noch in den Monaten gerechtfertigt war, in denen die Kohortenstudie 2 durchgeführt wurde.

Positive Befunde waren mit dem DFZM-IgG-Test bei den alle 1 bis 3 Monate wiederholten Untersuchungen nur selten zweimal und nie öfter hintereinander zu erheben. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Stewart *et al.* (2007), denen der Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern bei MAP-infizierten Kälbern wenn überhaupt, dann ebenfalls immer nur über einen begrenzten Zeitraum gelang. So waren die Antikörpertiter nur bei 2 von 5 Kälbern, welche experimentell mit dem MAP-Stamm CLIJ623 infiziert worden waren, erhöht, und zwar im 8.-12. bzw. im 21.-25. Monat p.i.. In ähnlicher Weise reagierten 3 von 5 anderen Kälbern, die in derselben Studie mit infektiöser Darmmukosa einer Paratuberkulose-kranken Kuh infiziert worden waren, nur zwischen dem 9. und 54. bzw. 21. und 25. bzw. 20. und 23. Monat p.i. seropositiv. Obwohl man davon ausgeht, dass die MAP-Infektion lebenslang persistiert (Clarke, 1997), scheint der Erreger erst allmählich und am Anfang nur schubweise als immunogener Stimulus vom betroffenen Tier wahrgenommen zu werden. Dies könnte bedeuten, dass der Erreger anfänglich vom Abwehrsystem immer wieder erfolgreich zurück gedrängt wird oder dass es ihm gelingt, sich der immunologischen Erkennung und Gegenreaktion immer wieder zu entziehen (Stabel, 2000a; siehe auch **Kapitel II 2**).

Nach diesen Ergebnissen bietet der DFZM-IgG-Test bei der serologischen Untersuchung von Jungtieren im zweiten Lebensjahr Vorteile gegenüber dem DFZM-IgG₁-Test und dem Pourquoi[®]-ELISA. Allerdings sind wegen der bei MAP-Infektionen nur langsam einsetzenden Immunantwort wiederholte Untersuchungen erforderlich (z.B. alle 2 Monate ab dem 10. Lebensmonat), um infizierte Tiere bereits innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zu entdecken.

Schlussfolgerungen

- Die etablierten DFZM-Ak-Tests sind wertvolle neue Diagnostika zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper beim Rind.
- Der etablierte DFZM-IgG-Test und der etablierte DFZM-IgG₁-Test sind zur serologischen Erkennung von MAP-ausscheidenden Rindern im Alter von mindestens 2 Jahren sensitiver und spezifischer als 3 kommerziell erhältliche ELISAs.
- Der DFZM-IgG₁-Test und der DFZM-IgG-Test sind sensitiver als der Pourquier®-ELISA, um MAP-infizierte Kälber im ersten Lebensjahr zu identifizieren. Der Nachweis einer Serokonversion war unter den experimentellen Bedingungen dieser Untersuchung frühestens ab der 44. Woche *post infectionem* (W.p.i.) möglich.
- Der DFZM-IgG-Test scheint bei Jungrindern im zweiten Lebensjahr sensitiver zu sein als der DFZM-IgG₁-Test.
- Unabhängig vom eingesetzten Test reagiert ein Großteil der MAP-infizierten Rinder im ersten Lebensjahr seronegativ (in dieser Arbeit 4 von 6 Kälbern).
- Bei keinem der MAP-infizierten Kälber konnte ein Anstieg des mit einer T_H1-Antwort assoziierten MAP-spezifischen IgG₂ oder IgM beobachtet werden. Auch bei adulten Rindern erreichte der Nachweis von IgG₂ bei gerade 100 %iger Spezifität nur eine 44,4 %ige Sensitivität. MAP-spezifisches IgG₂ und IgM ist somit als Parameter zur Identifizierung MAP-positiver Tiere ungeeignet (Kälber) bzw. wenig geeignet (Rinder im Alter von mindestens 2 Jahren).
- Die Untersuchung auf MAP-spezifische Antikörper, welche vom Kalb selbst gebildet wurden, ist im DFZM-IgG- bzw. DFZM-IgG₁-Test aufgrund vorhandener maternaler Antikörper erst ab dem 121. Lebenstag sinnvoll.
- Zum Nachweis einer MAP-spezifischen Serokonversion bei Kälbern bzw. Jung-rindern sind aufgrund der nur langsam einsetzenden Immunantwort wiederholte Untersuchungen erforderlich, um Reagenten bereits innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zu entdecken.
- Neugeborene Kälber, die hinreichend Kolostrum aufgenommen haben, können in Verbindung mit dem DFZM-IgG₁-Test als Sentinel verwendet werden, um serologisch den MAP-Infektionsstatus des Muttertieres (bzw. der Kolostrum-spendenden Kuh) zu ermitteln.

VI Zusammenfassung

Neben dem zeitaufwendigen und kostspieligen direkten Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) mittels Kultur oder PCR, wird zur Erkennung von MAP-infizierten Rindern gegenwärtig der ELISA eingesetzt. Die derzeit erhältlichen ELISAs zum Nachweis einer Infektion mit MAP weisen jedoch entweder eine niedrige Sensitivität oder eine niedrige Spezifität auf (Nielsen und Toft, 2008). Deshalb war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, neue, auf der Durchflusszytometrie (DFZM) basierende Verfahren zum Nachweis MAP-spezifischer Antikörper zu etablieren und zu evaluieren. Dazu sollten diese DFZM-Ak-Tests an experimentell mit MAP infizierten Kälbern und an natürlich MAP-infizierten Rindern im Vergleich zum Pourquier®-ELISA und zum MAP-Direktnachweis geprüft werden.

Bei der Untersuchung der Serumproben von 22 MAP-negativen und 18 MAP-positiven adulten Rindern erreichte der DFZM-IgG₁-Test im Vergleich zu 3 in Deutschland lizenzierten ELISAs die höchste Sensitivität. Betrachtet man die Kotuntersuchung als Goldstandard, so erreichte der DFZM-IgG₁-Test nach ROC-Analyse bei gerade 100 %iger Spezifität eine Sensitivität von 77,8 %. Bei Verwendung der vom Hersteller angegebenen Cut Off-Werte erreichten die ELISAs nur Sensitivitäten von 61,1 % (Pourquier®-ELISA) bzw. 27,8 % (Cattletype®-ELISA) bzw. 27,8 % (Svanovir®-ELISA) bei 100 %iger Spezifität.

In einer longitudinalen Studie der experimentellen MAP-Infektion wurden 6 Kälber oral mit 1×10^9 KbE des MAP-Stammes K10 inokuliert. Weitere 6 Kälber wurden scheininokuliert und dienten als Kontrollgruppe. Im DFZM-IgG- bzw. DFZM-IgG₁-Test wurde bei 2 von 5 Kälbern ab der 44. bzw. 46. Woche *post infectionem* (W.p.i.) eine Serokonversion der MAP-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Bei keinem Kalb kam es zum Anstieg MAP-spezifischer IgG₂- oder IgM-Antikörper. Im Pourquier®-ELISA reagierten 5 Kälber stets seronegativ, ein Kalb erzielte zu den letzten beiden Beprobungszeitpunkten (50. und 52. W.p.i.) ein serologisch fragliches Ergebnis.

Die Dynamik von MAP-spezifischen maternalen Antikörpern wurde an je 6 Kälbern aus seropositiven und seronegativen Muttertieren untersucht. Bei allen 6 Kälbern aus seropositiven Muttertieren waren nach der Kolostrumaufnahme MAP-spezifische Antikörper mit dem DFZM-IgG- bzw. DFZM-IgG₁-Test nachweisbar, deren Titer in den folgenden Wochen kontinuierlich sank. Je größer der Titer bei der ersten Untersuchung war, desto länger reagierten die Kälber seropositiv oder fraglich, längstens aber bis zum 121. Lebenstag. Im Pourquier®-ELISA reagierten nur 3 der 6

Kälber positiv, wobei ihr Titer längstens bis zum 60., 63. bzw. 104. Lebenstag im positiven bzw. fraglichen Bereich lag.

Zur Evaluierung der DFZM-Ak-Tests an Jungrindern wurden weibliche Rinder im Alter von 8 bis 22 Monaten in Abständen von ca. 1-3 Monaten wiederholt serologisch untersucht. Dabei reagierten im DFZM-IgG-Test 6 von 24 Tieren (25 %) in einem MAP-Problembetrieb mindestens einmal seropositiv. Aber auch 3 von 10 Jungrindern (30 %) eines zunächst als MAP-unverdächtig eingestuften Betriebs waren jeweils mindestens einmal seropositiv. Im Pourquoi®-ELISA reagierten nur je ein Jungrind des MAP-Problembetriebes und des MAP-unverdächtigen Betriebes jeweils einmal serologisch fraglich.

Nach diesen Ergebnissen ist insbesondere der hier neu etablierte DFZM-IgG₁-Test für die MAP-Serodiagnostik an Kälbern und Kühen im Alter von mindestens 2 Jahren sensitiver und spezifischer als 3 derzeit in Deutschland zugelassene ELISAs. Eine humorale Immunreaktion bei Kälbern ist aber auch mit dem DFZM-IgG₁-Test frühestens erst 10 Monate nach der Infektion nachweisbar. Ferner kann ein Großteil der Kälber während der ersten 12 Monate selbst mit diesem Test nicht als MAP-infiziert erkannt werden. MAP-spezifische Antikörper maternalen Herkunft können bei Kälbern bis zum ca. 121. Lebenstag eine eigene humorale Immunreaktion vortäuschen, weshalb der Einsatz des DFZM-IgG- oder des DFZM-IgG₁-Tests oder des Pourquoi®-ELISA zum Nachweis einer aktiven Immunisierung erst ab dem 5. Lebensmonat sinnvoll ist. MAP-spezifische IgG₂- oder IgM-Antikörper sind als Parameter einer bestehenden MAP-Infektion nicht (Kälber) oder wenig (Rinder ≥ 2 Jahre) geeignet. Aufgrund der bei MAP-Infektionen nur verzögert einsetzenden Immunantwort sind wiederholte serologische Untersuchungen erforderlich (z.B. alle 2 Monate ab dem 10. Lebensmonat), um MAP-infizierte Rinder bereits innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zu entdecken. Die Früherkennung von MAP-Infektionen mittels serologischer Verfahren bleibt somit weiterhin eine Herausforderung.

VII Summary

Concerning expenditure of time and costs serological assays such as ELISA offer several advantages over methods like faecal culture or PCR tests for the detection of infections with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in cattle. However, the sensitivities and/or specificities of currently available ELISA tests are limited (Nielsen und Toft, 2008). The aim of this study was to develop and evaluate novel flow cytometry (FC) based assays for the detection of MAP-specific antibodies in bovine serum samples. These FC-Ab assays were supposed to be tested in calves experimentally infected with MAP and in naturally MAP-infected cows in comparison to the Pourquier®-ELISA or direct detection methods.

When 22 MAP-free and 18 MAP-shedding cows were examined, the FC-IgG₁ assay was more sensitive compared to three ELISA tests currently licensed in Germany. Defining the faecal culture result as gold standard, ROC analysis revealed a sensitivity of 77.8 % at 100 % specificity of the FC-IgG₁ assay. Using cut off values set up by manufacturers, sensitivities of the ELISAs were only 61.1 % (Pourquier®-ELISA), 27.8 % (Cattletype®-ELISA), and 27.8 % (Svanovir®-ELISA) at 100 % specificity.

In a longitudinal study of experimental infection 6 calves were inoculated orally with 1×10^9 CFU of MAP strain K10. Six mock-infected calves served as controls. Using the novel FC-IgG and the FC-IgG₁ assays seroconversion of MAP-specific antibodies were detectable in 2 of 5 MAP-infected calves from 44. or 46. week post infection (w.p.i.) onwards, respectively. Seroconversion of MAP-specific IgG₂ or IgM did not occur. Using the Pourquier®-ELISA 5 calves proved seronegative while one calf exhibited questionable results in the last two samples collected at 50. and 52. w.p.i..

Dynamics of MAP-specific maternal antibodies were examined in six calves from seropositive dams and six calves from seronegative dams. After colostrum uptake MAP-specific antibodies were detectable by FC-IgG and FC-IgG₁ assay in all 6 calves from seropositive dams. After first detection MAP-specific antibody titers declined continuously. The higher the initial titer the longer calves remained seropositive or exhibited questionable results to a maximum of 121. day of life. Only 3 of these 6 calves proved seropositive or questionable in the Pourquier®-ELISA. ELISA results remained positive or questionable until the 60., 63. or 104. day of life at latest, respectively.

In order to evaluate FC-Ab assays with young cattle, female cattle between 8 and 22 months of age were sampled repeatedly in intervals of 1-3 months. Six of 24 tested

females (25 %) in a herd with confirmed cases of paratuberculosis proved seropositive by FC-IgG assay at least once during the observation period. However, 3 of 10 females (30 %) in a MAP-unsuspicious herd reacted seropositive at least once as well. Using the Pourquier®-ELISA only one animal in the paratuberculosis herd and one animal in the unsuspicious herd exhibited questionable results; none of the samples yielded positive results.

In conclusion, regarding MAP serodiagnosis in calves and adult cattle older than 2 years, the novel FC-IgG₁ assay proved more sensitive and specific than 3 licensed ELISA kits. However, even this assay does not allow detection of a humoral immune response to MAP earlier than 10 months after oral ingestion of the pathogen. Additionally, even with this assay the majority of infected calves cannot be identified during the first 12 months of infection. MAP-specific antibodies of maternal origin persist in the calf until the 121. day of life and can simulate an active immune response. Therefore, application of the FC-IgG or FC-IgG₁ assay or the Pourquier®-ELISA is not reasonable before the 5th month of life if active humoral immunization to MAP is to be detected. MAP-specific IgG₂- or IgM are no suitable or less suitable indicators of an existing MAP infection in cattle. Due to the delayed and batch-wise onset of immune responses repeated examination (e.g. every 2 months beginning at the age of 10 months) appears reasonable in order to detect MAP infections as early as possible within the first 2 years of life. Early diagnosis of MAP by serology still remains a challenge.

VIII Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., K. M. Murphy und A. Sher (1996). *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature 383 (6603): 787-93.
- Abbas, B. und H. P. Riemann (1988). *IgG, IgM and IgA in the serum of cattle naturally infected with Mycobacterium paratuberculosis*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 11 (3-4): 171-5.
- Aduriz, J. J., R. A. Juste und N. Cortabarria (1995). *Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis*. Vet Microbiol 45 (2-3): 211-7.
- Allen, W. M., C. N. Hebert und D. S. Patterson (1968). *In vitro studies of leucocyte migration in cattle infected with Mycobacterium johnei*. Tubercle 49 (4): 397-403.
- Baksh, F. K., S. D. Finkelstein, S. M. Ariyanayagam-Baksh, P. A. Swalsky, E. C. Klein und J. C. Dunn (2004). *Absence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the microdissected granulomas of Crohn's disease*. Mod Pathol 17 (10): 1289-94.
- Banasure, K. D., S. H. Basagoudanavar, P. Chaudhury, V. Tiwari, N. S. Parihar und P. P. Goswami (2001). *Identification and characterization of a gene encoding a 35-kDa protein from Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 196 (2): 195-9.
- Bannantine, J. P., E. Baechler, Q. Zhang, L. Li und V. Kapur (2002). *Genome scale comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Mycobacterium avium subsp. avium reveals potential diagnostic sequences*. J Clin Microbiol 40 (4): 1303-10.
- Bannantine, J. P., D. O. Bayles, W. R. Waters, M. V. Palmer, J. R. Stabel und M. L. Paustian (2008). *Early antibody response against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis antigens in subclinical cattle*. Proteome Sci 6: 5.
- Bannantine, J. P., J. K. Hansen, M. L. Paustian, A. Amonsing, L. L. Li, J. R. Stabel und V. Kapur (2004). *Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Clin Microbiol 42 (1): 106-14.
- Bannantine, J. P., J. F. Huntley, E. Miltner, J. R. Stabel und L. E. Bermudez (2003). *The Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells*. Microbiology 149 (8): 2061-9.
- Bannantine, J. P. und J. R. Stabel (2000). *HspX is present within Mycobacterium paratuberculosis-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle*. Vet Microbiol 76 (4): 343-58.
- Bannantine, J. P., W. R. Waters, J. R. Stabel, M. V. Palmer, L. Li, V. Kapur und M. L. Paustian (2008). *Development and use of a partial Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis protein array*. Proteomics 8 (3): 463-74.
- Barclay, R., D. F. Ewing und C. Ratledge (1985). *Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of Mycobacterium avium, Mycobacterium*

- intracellulare, Mycobacterium scrofulaceum, and Mycobacterium paratuberculosis*. J Bacteriol 164 (2): 896-903.
- Barclay, R. und C. Ratledge (1983). *Iron-binding compounds of Mycobacterium avium, M. intracellulare, M. scrofulaceum, and mycobactin-dependent M. paratuberculosis and M. avium*. J Bacteriol 153 (3): 1138-46.
- Barnes, P. F., V. Mehra, B. Rivoire, S. J. Fong, P. J. Brennan, M. S. Voegtline, P. Minden, R. A. Houghten, B. R. Bloom und R. L. Modlin (1992). *Immunoreactivity of a 10-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 148 (6): 1835-40.
- Barrington, G. M., J. M. Gay, I. S. Eriks, W. C. Davis, J. F. Evermann, C. Emerson, J. L. O'Rourke, M. J. Hamilton und D. S. Bradway (2003). *Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced paratuberculosis infections*. J Vet Diagn Invest 15 (2): 195-200.
- Barrington, G. M. und S. M. Parish (2001). *Bovine neonatal immunology*. Vet Clin North Am Food Anim Pract 17 (3): 463-76.
- Baumgarth, N., O. C. Herman, G. C. Jager, L. Brown, L. A. Herzenberg und L. A. Herzenberg (1999). *Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system*. Proc Natl Acad Sci U S A 96 (5): 2250-5.
- Beard, P. M., M. J. Daniels, D. Henderson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. Rhind, A. Greig, M. R. Hutchings, I. McKendrick, K. Stevenson und J. M. Sharp (2001). *Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland*. J Clin Microbiol 39 (4): 1517-21.
- Beard, P. M., S. M. Rhind, D. Buxton, M. J. Daniels, D. Henderson, A. Pirie, K. Rudge, A. Greig, M. R. Hutchings, K. Stevenson und J. M. Sharp (2001). *Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland*. J Comp Pathol 124 (4): 290-9.
- Beard, P. M., K. Stevenson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. M. Rhind, M. C. Sinclair, L. A. Wildblood, D. G. Jones und J. M. Sharp (2001). *Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Clin Microbiol 39 (9): 3080-4.
- Beard, P. M. H., D.; Daniels, M. J.; Pirie, A.; Buxton, D.; Greig, A.; Hutchings, M. R.; McKendrick, I.; Rhind, S.; Stevenson, K.; Sharp, J. M. (1999). *Evidence of paratuberculosis in fox (Vulpes vulpes) and stoat (Mustela erminea)*. The Veterinary Record 145: 612-613.
- Begara-McGorum, I., L. A. Wildblood, C. J. Clarke, K. M. Connor, K. Stevenson, C. J. McInnes, J. M. Sharp und D. G. Jones (1998). *Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis*. Vet Immunol Immunopathol 63 (3): 265-87.
- Bernstein, C. N., J. F. Blanchard, P. Rawsthorne und M. T. Collins (2004). *Population-based case control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis*. J Clin Microbiol 42 (3): 1129-35.
- Berrebi, D., R. Maudinas, J. P. Hugot, M. Chamaillard, F. Chareyre, P. De Lagausie, C. Yang, P. Desreumaux, M. Giovannini, J. P. Cezard, H. Zouali, D. Emilie und M. Peuchmaur (2003). *Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon*. Gut 52 (6): 840-6.

- Biet, F., S. Bay, V. C. Thibault, D. Euphrasie, M. Grayon, C. Ganneau, P. Lanotte, M. Daffe, R. Gokhale, G. Etienne und J. M. Reytrat (2008). *Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from M. avium subsp. avium*. Vaccine 26 (2): 257-68.
- Biet, F., L. Gendt, E. Anton, E. Ballot, J. P. Hugot und C. Johanet (2011). *Serum antibodies to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis combined with anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in Crohn's disease patients: prevalence and diagnostic role*. Dig Dis Sci 56 (6): 1794-800.
- Billman-Jacobe, H. (2004). *Glycopeptidolipid synthesis in mycobacteria*. Curr Sci 86 (1): 111-114.
- Billman-Jacobe, H., M. Carrigan, F. Cockram, L. A. Corner, I. J. Gill, J. F. Hill, T. Jessep, A. R. Milner und P. R. Wood (1992). *A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle*. Aust Vet J 69 (2): 25-8.
- Böttcher, J. und A. Gangl (2004). *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis--combined serological testing and classification of individual animals and herds*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 51 (10): 443-8.
- Brady, C., D. O'Grady, F. O'Meara, J. Egan und H. Bassett (2008). *Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in 21 cows from herds affected by Johne's disease*. Vet Rec 162 (5): 147-52.
- Brennan, P. J. und H. Nikaido (1995). *The envelope of mycobacteria*. Annu Rev Biochem 64: 29-63.
- Brown, W. C., W. C. Davis und W. Tuo (1996). *Human interleukin-12 upregulates proliferation and interferon-gamma production by parasite antigen-stimulated Th cell clones and gamma/delta T cells of cattle*. Ann N Y Acad Sci 795: 321-4.
- Brown, W. C., A. C. Rice-Ficht und D. M. Estes (1998). *Bovine type 1 and type 2 responses*. Vet Immunol Immunopathol 63 (1-2): 45-55.
- Buergelt, C. D., C. Hall, K. McEntee und J. R. Duncan (1978). *Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle*. Vet Pathol 15 (2): 196-207.
- Buergelt, C. D., A. W. Layton, P. E. Ginn, M. Taylor, J. M. King, P. L. Habecker, E. Mauldin, R. Whitlock, C. Rossiter und M. T. Collins (2000). *The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (Bison bison)*. Vet Pathol 37 (5): 428-38.
- Buergelt, C. D. und J. E. Williams (2004). *Nested PCR on blood and milk for the detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis*. Aust Vet J 82 (8): 497-503.
- Butler, J. E. (1983). *Bovine immunoglobulins: an augmented review*. Vet Immunol Immunopathol 4 (1-2): 43-152.
- Cameron, R. M., K. Stevenson, N. F. Inglis, J. Klausen und J. M. Sharp (1994). *Identification and characterization of a putative serine protease expressed in vivo by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Microbiology 140 (8): 1977-82.

- Camphausen, R. T., R. L. Jones und P. J. Brennan (1985). *A glycolipid antigen specific to Mycobacterium paratuberculosis: structure and antigenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A 82 (10): 3068-72.
- Cetinkaya, B., H. M. Erdogan und K. L. Morgan (1997). *Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England*. Prev Vet Med 32 (3-4): 253-66.
- Chambers, M. A., D. Gavier-Widen und R. G. Hewinson (2004). *Antibody bound to the surface antigen MPB83 of Mycobacterium bovis enhances survival against high dose and low dose challenge*. FEMS Immunol Med Microbiol 41 (2): 93-100.
- Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan und B. R. Bloom (1991). *Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages*. Infect Immun 59 (5): 1755-61.
- Chatterjee, D. und K. H. Khoo (2001). *The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties*. Cell Mol Life Sci 58 (14): 2018-42.
- Chiodini, R. J. (1993). *Abolish Mycobacterium paratuberculosis strain 18*. J Clin Microbiol 31 (7): 1956-8.
- Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen und R. S. Merkal (1984). *Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects*. Cornell Vet 74 (3): 218-62.
- Cho, D. und M. T. Collins (2006). *Comparison of the proteosomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by Mycobacterium paratuberculosis*. Clin Vaccine Immunol 13 (10): 1155-61.
- Cho, D., N. Sung und M. T. Collins (2006). *Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis*. Proteomics 6 (21): 5785-94.
- Cho, H. J., S. C. Entz, G. T. Green und L. T. Jordan (2002). *A blocking ELISA with improved sensitivity for the detection of passively acquired maternal antibodies to BHV-1*. Can Vet J 43 (1): 43-5.
- Clarke, C. J. (1997). *Paratuberculosis and molecular biology*. Vet J 153 (3): 245-7.
- Clarke, C. J. (1997). *The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species*. J Comp Pathol 116 (3): 217-61.
- Cobb, A. J. und R. Frothingham (1999). *The GroES antigens of Mycobacterium avium and Mycobacterium paratuberculosis*. Vet Microbiol 67 (1): 31-5.
- Cocito, C., M. C. Baelden und C. Benoit (1987). *Immunological properties of antigen 60 of BCG. Induction of humoral and cellular immune reactions*. Scand J Immunol 25 (6): 579-85.
- Cocito, C., P. Gilot, M. Coene, M. de Kesel, P. Poupart und P. Vannuffel (1994). *Paratuberculosis*. Clin Microbiol Rev 7 (3): 328-45.
- Coetsier, C., X. Havaux, F. Mattelard, S. Sadatte, F. Cormont, K. Buergelt, B. Limbourg, D. Latinne, H. Bazin, J. F. Deneff und C. Cocito (1998). *Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures*. Clin Diagn Lab Immunol 5 (4): 446-51.

- Colgrove, G. S., C. O. Thoen, B. O. Blackburn und C. D. Murphy (1989). *Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture*. Vet Microbiol 19 (2): 183-7.
- Collins, D. M., D. M. Gabric und G. W. De Lisle (1989). *Identification of a repetitive DNA sequence specific to Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 51 (1): 175-8.
- Collins, D. M., D. M. Gabric und G. W. de Lisle (1990). *Identification of two groups of Mycobacterium paratuberculosis strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization*. J Clin Microbiol 28 (7): 1591-6.
- Collins, M. T. (2006). *Proper estimation of sensitivity and specificity*. Clin Vaccine Immunol 13 (12): 1373; author reply 1373-4.
- Collins, M. T., G. Lisby, C. Moser, D. Chicks, S. Christensen, M. Reichelderfer, N. Hoiby, B. A. Harms, O. O. Thomsen, U. Skibsted und V. Binder (2000). *Results of multiple diagnostic tests for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in patients with inflammatory bowel disease and in controls*. J Clin Microbiol 38 (12): 4373-81.
- Collins, M. T., D. C. Sockett, S. Ridge und J. C. Cox (1991). *Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease*. J Clin Microbiol 29 (2): 272-6.
- Collins, M. T., S. J. Wells, K. R. Petrini, J. E. Collins, R. D. Schultz und R. H. Whitlock (2005). *Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol 12 (6): 685-92.
- Cousins, D. V., R. Whittington, I. Marsh, A. Masters, R. J. Evans und P. Kluver (1999). *Mycobacteria distinct from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis*. Mol Cell Probes 13 (6): 431-42.
- Coussens, P. M. (2001). *Mycobacterium paratuberculosis and the bovine immune system*. Anim Health Res Rev 2 (2): 141-61.
- Coussens, P. M. (2004). *Model for immune responses to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in cattle*. Infect Immun 72 (6): 3089-96.
- Coussens, P. M., C. J. Colvin, G. J. Rosa, J. Perez Laspiur und M. D. Elftman (2003). *Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected cattle*. Infect Immun 71 (11): 6487-98.
- Coussens, P. M., N. Verman, M. A. Coussens, M. D. Elftman und A. M. McNulty (2004). *Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern*. Infect Immun 72 (3): 1409-22.
- Crohn, B. B., L. Ginzburg und G. D. Oppenheimer (1952). *Regional ileitis; a pathologic and clinical entity*. Am J Med 13 (5): 583-90.
- Dahme, E. und E. Weiss (1999). *Grundriß der Speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 188-189.

- Daniels, M. J., N. Ball, M. R. Hutchings und A. Greig (2001). *The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis*. Vet J 161 (3): 306-13.
- Daniels, M. J., M. R. Hutchings, P. M. Beard, D. Henderson, A. Greig, K. Stevenson und J. M. Sharp (2003). *Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland?* J Wildl Dis 39 (1): 10-5.
- Darcel, C. (1995). *Diagnosis of infection with Mycobacterium paratuberculosis*. Can Vet J 36 (4): 199-200.
- Dargatz, D. A., B. A. Byrum, L. K. Barber, R. W. Sweeney, R. H. Whitlock, W. P. Shulaw, R. H. Jacobson und J. R. Stabel (2001). *Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle*. J Am Vet Med Assoc 218 (7): 1163-6.
- de Almeida, D. E., C. J. Colvin und P. M. Coussens (2008). *Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis*. Vet Immunol Immunopathol 125 (3-4): 234-45.
- De Kesel, M., P. Gilot, M. Coene und C. Cocito (1992). *Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of Mycobacterium paratuberculosis*. Scand J Immunol 36 (2): 201-12.
- De Kesel, M., P. Gilot, M. C. Misonne, M. Coene und C. Cocito (1993). *Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of Mycobacterium paratuberculosis: its application to serological analysis of Johne's disease*. J Clin Microbiol 31 (4): 947-54.
- de Lisle, G. W., B. S. Samagh und J. R. Duncan (1980). *Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response*. Can J Comp Med 44 (2): 183-91.
- de Lisle, G. W., P. Seguin, B. S. Samagh, A. H. Corner und J. R. Duncan (1980). *Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests*. Can J Comp Med 44 (2): 177-82.
- Detilleux, J. C., M. E. Kehrli, Jr., J. R. Stabel, A. E. Freeman und D. H. Kelley (1995). *Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production*. Vet Immunol Immunopathol 44 (3-4): 251-67.
- Doran, T. J., J. K. Davies, A. J. Radford und A. L. Hodgson (1994). *Putative functional domain within ORF2 on the Mycobacterium insertion sequences IS900 and IS902*. Immunol Cell Biol 72 (5): 427-34.
- Douglas, V. L., J. S. Cullor, J. W. Tyler, M. C. Thurmond und R. B. Bushnell (1989). *Rapid decay of serum IgG recognizing gram-negative cell wall core antigens in neonatal calves*. Am J Vet Res 50 (7): 1138-40.
- Dupont, C., K. Thompson, C. Heuer, B. Gicquel und A. Murray (2005). *Identification and characterization of an immunogenic 22 kDa exported protein of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. J Med Microbiol 54 (11): 1083-92.
- Eckstein, T. M., S. Chandrasekaran, S. Mahapatra, M. R. McNeil, D. Chatterjee, C. D. Rithner, P. W. Ryan, J. T. Belisle und J. M. Inamine (2006). *A major cell wall lipopeptide of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. J Biol Chem 281 (8): 5209-15.

- Eda, S., J. P. Bannantine, W. R. Waters, Y. Mori, R. H. Whitlock, M. C. Scott und C. A. Speer (2006). *A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease*. Clin Vaccine Immunol 13 (8): 837-44.
- Eda, S., B. Elliott, M. C. Scott, W. R. Waters, J. P. Bannantine, R. H. Whitlock und C. A. Speer (2005). *New method of serological testing for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Johne's disease) by flow cytometry*. Foodborne Pathog Dis 2 (3): 250-62.
- Egan, S., M. Lanigan, B. Shiell, G. Beddome, D. Stewart, J. Vaughan und W. P. Michalski (2008). *The recovery of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the intestine of infected ruminants for proteomic evaluation*. J Microbiol Methods 75 (1): 29-39.
- El-Zaatari, F. A., S. A. Naser, L. Engstrand, P. E. Burch, C. Y. Hachem, D. L. Whipple und D. Y. Graham (1995). *Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from Mycobacterium paratuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol 2 (6): 657-64.
- El-Zaatari, F. A., S. A. Naser, L. Engstrand, C. Y. Hachem und D. Y. Graham (1994). *Identification and characterization of Mycobacterium paratuberculosis recombinant proteins expressed in E. coli*. Curr Microbiol 29 (3): 177-84.
- El-Zaatari, F. A., S. A. Naser und D. Y. Graham (1997). *Characterization of a specific Mycobacterium paratuberculosis recombinant clone expressing 35,000-molecular-weight antigen and reactivity with sera from animals with clinical and subclinical Johne's disease*. J Clin Microbiol 35 (7): 1794-9.
- Ellingson, J. L., J. L. Anderson, J. J. Koziczkowski, R. P. Radcliff, S. J. Sloan, S. E. Allen und N. M. Sullivan (2005). *Detection of viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR*. J Food Prot 68 (5): 966-72.
- Ellingson, J. L., C. A. Bolin und J. R. Stabel (1998). *Identification of a gene unique to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and application to diagnosis of paratuberculosis*. Mol Cell Probes 12 (3): 133-42.
- Ellner, J. J. und T. M. Daniel (1979). *Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan*. Clin Exp Immunol 35 (2): 250-7.
- Elluru, S. R., J. Vani, S. Delignat, M. F. Bloch, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, S. V. Kaveri und J. Bayry (2008). *Modulation of human dendritic cell maturation and function by natural IgG antibodies*. Autoimmun Rev 7 (6): 487-90.
- Englund, S., G. Bolske und K. E. Johansson (2002). *An IS900-like sequence found in a Mycobacterium sp. other than Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 209 (2): 267-71.
- Erhard, M. H., Amon, P., Younan, M., Ali, Z., Stangassinger, M. (1999). *Absorption and synthesis of immunoglobulin G in newborn calves*. Reprod. Dom. An. 34: 173-175.
- Estes, D. M. (1996). *Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression*. Vet Immunol Immunopathol 54 (1-4): 61-7.

- Estes, D. M. und W. C. Brown (2002). *Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle*. Vet Immunol Immunopathol 90 (1-2): 1-10.
- Estes, D. M., N. M. Closser und G. K. Allen (1994). *IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen*. Cell Immunol 154 (1): 287-95.
- Estes, D. M., A. Hirano, V. T. Heussler, D. A. Dobbelaere und W. C. Brown (1995). *Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro*. Cell Immunol 163 (2): 268-79.
- Fabre, I., O. L'Homme, M. Bruneteau, G. Michel und C. Cocito (1986). *Chemical composition of antigen 60 from Mycobacterium bovis BCG*. Scand J Immunol 24 (5): 591-602.
- Fonseca, D. P., D. Joosten, H. Snippe und A. F. Verheul (2000). *Evaluation of T-cell responses to peptides and lipopeptides with MHC class I binding motifs derived from the amino acid sequence of the 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Immunol 37 (8): 413-22.
- Fry, M. P., J. Kruze und M. T. Collins (2008). *Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds*. J Vet Diagn Invest 20 (3): 329-32.
- Fujita, H., Y. Eishi, I. Ishige, K. Saitoh, T. Takizawa, T. Arima und M. Koike (2002). *Quantitative analysis of bacterial DNA from Mycobacteria spp., Bacteroides vulgatus, and Escherichia coli in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases*. J Gastroenterol 37 (7): 509-16.
- Galili, U., J. Buehler, S. B. Shohet und B. A. Macher (1987). *The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies*. J Exp Med 165 (3): 693-704.
- Gangl, A., D. Janowetz, D. Hoffmann und J. Böttcher (2009). Paratuberkulose: SMAPS I. ist tot - es lebe SMAPS II. 7. Stendaler Symposium zur BHV-1-, BVD-, BTV- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal.
- Gilmour, N. J. und J. Goudswaard (1972). *Corynebacterium renale as a cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease*. J Comp Pathol 82 (3): 333-6.
- Gilot, P., M. De Kesel, M. Coene und C. Cocito (1992). *Induction of cellular immune reactions by A36, an antigen complex of Mycobacterium paratuberculosis: comparison of A36 and johnin components*. Scand J Immunol 36 (6): 811-21.
- Gilot, P., M. De Kesel, L. Machtelinckx, M. Coene und C. Cocito (1993). *Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-kilodalton protein of Mycobacterium paratuberculosis*. J Bacteriol 175 (15): 4930-5.
- Glawischnig, W., T. Steineck und J. Spergser (2006). *Infections caused by Mycobacterium avium subspecies avium, hominissuis, and paratuberculosis in free-ranging red deer (Cervus elaphus hippelaphus) in Austria, 2001-2004*. J Wildl Dis 42 (4): 724-31.

- Gonda, M. G., Y. M. Chang, G. E. Shook, M. T. Collins und B. W. Kirkpatrick (2006). *Genetic variation of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in US Holsteins*. J Dairy Sci 89 (5): 1804-12.
- Grant, I. R. (2005). *Zoonotic potential of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: the current position*. J Appl Microbiol 98 (6): 1282-93.
- Green, E. P., M. L. Tizard, M. T. Moss, J. Thompson, D. J. Winterbourne, J. J. McFadden und J. Hermon-Taylor (1989). *Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res 17 (22): 9063-73.
- Greig, A., K. Stevenson, D. Henderson, V. Perez, V. Hughes, I. Pavlik, M. E. Hines, 2nd, I. McKendrick und J. M. Sharp (1999). *Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland*. J Clin Microbiol 37 (6): 1746-51.
- Gumber, S., G. Eamens und R. J. Whittington (2006). *Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without Mycobacterium paratuberculosis infection*. Vet Microbiol 115 (1-3): 91-101.
- Gumber, S., D. L. Taylor, I. B. Marsh und R. J. Whittington (2009). *Growth pattern and partial proteome of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis during the stress response to hypoxia and nutrient starvation*. Vet Microbiol 133 (4): 344-57.
- Gumber, S., D. L. Taylor und R. J. Whittington (2009). *Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection: Implications for pathogenesis and diagnosis*. Vet Microbiol 137 (3-4): 290-6.
- Gunnarsson, E. und F. H. Fodstad (1979). *Analysis of antigens in Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet Scand 20 (2): 200-15.
- Hacker, U., K. Huttner und M. Konow (2004). *[Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 117 (3-4): 140-4.
- Hampe, J., A. Cuthbert, P. J. Croucher, M. M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeyer, A. J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J. E. Lennard-Jones, U. R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber und C. G. Mathew (2001). *Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations*. Lancet 357 (9272): 1925-8.
- Hardy, R. R. und K. Hayakawa (1994). *CD5 B cells, a fetal B cell lineage*. Adv Immunol 55: 297-339.
- Harris, N. B. und R. G. Barletta (2001). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine*. Clin Microbiol Rev 14 (3): 489-512.
- Harth, G. und M. A. Horwitz (1999). *Export of recombinant Mycobacterium tuberculosis superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria*. J Biol Chem 274 (7): 4281-92.

- Hilbink, F., D. M. West, G. W. de Lisle, R. Kittelberger, B. D. Hosie, J. Hutton, M. M. Cooke und M. Penrose (1994). *Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep*. Vet Microbiol 41 (1-2): 107-16.
- Hines, M. E., 2nd, J. R. Stabel, R. W. Sweeney, F. Griffin, A. M. Talaat, D. Bakker, G. Benedictus, W. C. Davis, G. W. de Lisle, I. A. Gardner, R. A. Juste, V. Kapur, A. Koets, J. McNair, G. Pruitt und R. H. Whitlock (2007). *Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines*. Vet Microbiol 122 (3-4): 197-222.
- Hines, S. A., C. D. Buergelt, J. H. Wilson und E. L. Bliss (1987). *Disseminated Mycobacterium paratuberculosis infection in a cow*. J Am Vet Med Assoc 190 (6): 681-3.
- Hinger, M., H. Brandt und G. Erhardt (2008). *Heritability estimates for antibody response to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in German Holstein cattle*. J Dairy Sci 91 (8): 3237-44.
- Hohn, H., C. Kortsik, K. Nilges, A. Necker, K. Freitag, G. Tully, C. Neukirch und M. J. Maeurer (2001). *Human leucocyte antigen-A2 restricted and Mycobacterium tuberculosis 19-kDa antigen-specific CD8+ T-cell responses are oligoclonal and exhibit a T-cell cytotoxic type 2 response cytokine-secretion pattern*. Immunology 104 (3): 278-88.
- Hope, J. C., M. L. Thom, P. A. McCormick und C. J. Howard (2004). *Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria*. Vet Immunol Immunopathol 100 (3-4): 187-95.
- Horn, B., D. Forshaw, D. Cousins und P. J. Irwin (2000). *Disseminated Mycobacterium avium infection in a dog with chronic diarrhoea*. Aust Vet J 78 (5): 320-5.
- Hu, Y. und A. R. Coates (1999). *Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 181 (2): 469-76.
- Hughes, V., S. Smith, A. Garcia-Sanchez, J. Sales und K. Stevenson (2007). *Proteomic comparison of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis*. Microbiology 153 (Pt 1): 196-205.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou und G. Thomas (2001). *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature 411 (6837): 599-603.
- Huntley, J. F., J. R. Stabel und J. P. Bannantine (2005). *Immunoreactivity of the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis 19-kDa lipoprotein*. BMC Microbiol 5 (1): 3.
- Husband, A. J., M. R. Brandon und A. K. Lascelles (1972). *Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves*. Aust J Exp Biol Med Sci 50 (4): 491-8.
- Ivanyi, J., S. Sinha, R. Aston, D. Cussell, M. Keen und U. Sengupta (1983). *Definition of species specific and cross-reactive antigenic determinants of Mycobacterium leprae using monoclonal antibodies*. Clin Exp Immunol 52 (3): 528-36.

- Jakobsen, M. B., L. Alban und S. S. Nielsen (2000). *A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows*. Prev Vet Med 46 (1): 15-27.
- Janagama, H. K., T. M. Senthilkumar, J. P. Bannantine, G. M. Rodriguez, I. Smith, M. L. Paustian, J. A. McGarvey und S. Sreevatsan (2009). *Identification and functional characterization of the iron-dependent regulator (IdeR) of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Microbiology 155 (Pt 11): 3683-90.
- Jark, U., I. Ringena, B. Franz, G. F. Gerlach, M. Beyerbach und B. Franz (1997). *Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis*. Vet Microbiol 57 (2-3): 189-98.
- Jaster, E. H. (2005). *Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G1 absorption in Jersey calves*. J Dairy Sci 88 (1): 296-302.
- Jordan, H. L., L. A. Cohn und P. J. Armstrong (1994). *Disseminated Mycobacterium avium complex infection in three Siamese cats*. J Am Vet Med Assoc 204 (1): 90-3.
- Juste, R. A., J. M. Garrido, M. Geijo, N. Elguezabal, G. Aduriz, R. Atxaerandio und I. Sevilla (2005). *Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep*. J Vet Diagn Invest 17 (4): 354-9.
- Kalis, C. H., H. W. Barkema, J. W. Hesselink, C. van Maanen und M. T. Collins (2002). *Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. J Vet Diagn Invest 14 (3): 219-24.
- Kantor, A. B. und L. A. Herzenberg (1993). *Origin of murine B cell lineages*. Annu Rev Immunol 11: 501-38.
- Kawaji, S., L. Zhong und R. J. Whittington (2012). *Partial proteome of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis under oxidative and nitrosative stress*. Vet Microbiol 145 (3-4): 252-64.
- Khalifeh, M. S. und J. R. Stabel (2004). *Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle*. Infect Immun 72 (4): 1974-82.
- Khalifeh, M. S. und J. R. Stabel (2004). *Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease*. Vet Immunol Immunopathol 99 (1-2): 39-46.
- Khoo, K. H., J. B. Tang und D. Chatterjee (2001). *Variation in mannose-capped terminal arabinan motifs of lipoarabinomannans from clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium complex*. J Biol Chem 276 (6): 3863-71.
- Kim, J. W. und F. W. Schmidt (1983). *[Absorption of colostral immunoglobulins by the calf]*. Dtsch Tierarztl Wochenschr 90 (7): 283-6.
- Koets, A., A. Hoek, M. Langelaar, M. Overdijk, W. Santema, P. Franken, W. Eden und V. Rutten (2006). *Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis*. Vaccine 24 (14): 2550-9.

- Koets, A. P., G. Adugna, L. L. Janss, H. J. van Weering, C. H. Kalis, G. H. Wentink, V. P. Rutten und Y. H. Schukken (2000). *Genetic variation of susceptibility to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in dairy cattle*. J Dairy Sci 83 (11): 2702-8.
- Koets, A. P., V. P. Rutten, M. de Boer, D. Bakker, P. Valentin-Weigand und W. van Eden (2001). *Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection*. Infect Immun 69 (3): 1492-8.
- Kohler, H., B. Burkert, I. Pavlik, R. Diller, L. Geue, F. J. Conraths und G. Martin (2008). *Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in bovine serum*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 121 (5-6): 203-10.
- Köhler, H., B. Burkert, I. Pavlik, R. Diller, L. Geue, F. J. Conraths und G. Martin (2008). *Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in bovine serum*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 121 (5-6): 203-10.
- Koo, H. C., Y. H. Park, M. J. Hamilton, G. M. Barrington, C. J. Davies, J. B. Kim, J. L. Dahl, W. R. Waters und W. C. Davis (2004). *Analysis of the immune response to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in experimentally infected calves*. Infect Immun 72 (12): 6870-83.
- Lambrecht, G., H. Frerking und E. Henkel (1982). *[Determination of IgG, IgA and IgM in colostrum of cattle by nephelometry and radial immunodiffusion tests with particular consideration of season, lactation and genetics (author's transl)]*. Dtsch Tierarztl Wochenschr 89 (3): 107-10.
- Lambrecht, R. S., J. F. Carriere und M. T. Collins (1988). *A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing Mycobacterium sp.* Appl Environ Microbiol 54 (4): 910-6.
- Lambrecht, R. S. und M. T. Collins (1992). *Mycobacterium paratuberculosis. Factors that influence mycobactin dependence*. Diagn Microbiol Infect Dis 15 (3): 239-46.
- Lambrecht, R. S. und M. T. Collins (1993). *Inability to detect mycobactin in mycobacteria-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by mycobacteria in vivo*. Microb Pathog 14 (3): 229-38.
- Larsen, A. B., R. S. Merkal und R. C. Cutlip (1975). *Age of cattle as related to resistance to infection with Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 36 (3): 255-7.
- Larsen, A. B., A. I. Moyle und E. M. Himes (1978). *Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study*. Am J Vet Res 39 (1): 65-9.
- Larsen, A. B., O. H. Stalheim, D. E. Hughes, L. H. Appell, W. D. Richards und E. M. Himes (1981). *Mycobacterium paratuberculosis in the semen and genital organs of a semen-donor bull*. J Am Vet Med Assoc 179 (2): 169-71.
- Lee, B. Y., D. Chatterjee, C. M. Bozic, P. J. Brennan, D. L. Cohn, J. D. Bales, S. M. Harrison, L. A. Andron und I. M. Orme (1991). *Prevalence of serum antibody to the type-specific glycopeptidolipid antigens of Mycobacterium avium in human*

- immunodeficiency virus-positive and -negative individuals*. J Clin Microbiol 29 (5): 1026-9.
- Leid, J. G., D. Hunter und C. A. Speer (2002). *Early diagnosis of Johne's disease in the American bison by monoclonal antibodies directed against antigen 85*. Ann N Y Acad Sci 969: 66-72.
- Lemaire, M., V. Weynants, J. Godfroid, F. Schynts, G. Meyer, J. J. Letesson und E. Thiry (2000). *Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency*. J Clin Microbiol 38 (5): 1885-94.
- Lepper, A. W., C. R. Wilks, M. Kotiw, J. T. Whitehead und K. S. Swart (1989). *Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis and maintained on normal or high iron intake*. Aust Vet J 66 (2): 50-5.
- Leroy, B., S. Viart, N. Trincherro, V. Roupie, M. Govaerts, J. J. Letesson, K. Huygen und R. Wattiez (2009). *Use of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis specific coding sequences for serodiagnosis of bovine paratuberculosis*. Vet Microbiol 135 (3-4): 313-9.
- Levings, M. K., R. Bacchetta, U. Schulz und M. G. Roncarolo (2002). *The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells*. Int Arch Allergy Immunol 129 (4): 263-76.
- Li, L., J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal und V. Kapur (2005). *The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 102 (35): 12344-9.
- Lilenbaum, W., C. D. Marassi, R. Vargas, L. Medeiros, W. M. Oelemann und L. S. Fonseca (2009). *Occurrence of false-positive results in three paratuberculosis - ELISAs performed in a tuberculous herd*. Vet Res Commun 33 (7): 693-9.
- Liu, X., Z. Feng, N. B. Harris, J. D. Cirillo, H. Bercovier und R. G. Barletta (2001). *Identification of a secreted superoxide dismutase in Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 202 (2): 233-8.
- Lofstedt, J. und R. M. Jakowski (1989). *Diagnosis of avian tuberculosis in a horse by use of liver biopsy*. J Am Vet Med Assoc 194 (2): 260-2.
- Logan, E. F., W. J. Penhale und R. A. Jones (1973). *Changes in the serum immunoglobulin levels of colostrum-fed calves during the first 12 weeks postpartum*. Res Vet Sci 14 (3): 394-7.
- Lombard, J. E., T. M. Byrem, B. A. Wagner und B. J. McCluskey (2006). *Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy cattle*. J Vet Diagn Invest 18 (5): 448-58.
- Mach, J. P. und J. J. Pahud (1971). *Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions*. J Immunol 106 (2): 552-63.
- Machackova, M., P. Svastova, J. Lamka, I. Parmova, V. Liska, J. Smolik, O. A. Fischer und I. Pavlik (2004). *Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001)*. Vet Microbiol 101 (4): 225-34.
- Malamo, M., K. Okazaki, Y. Sakoda und H. Kida (2007). *Carboxyl terminus of the 34 kDa protein of Mycobacterium paratuberculosis shares homologous B-cell*

- epitopes with Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare*. Vet Rec 161 (25): 853-7.
- Malamo, M., Y. Sakoda, H. Ozaki und H. Kida (2006). *Development of ELISA to detect antibodies specific to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with truncated 34 kDa proteins*. Jpn J Vet Res 54 (2-3): 99-107.
- Matthews, P. R., A. McDiarmid, P. Collins und A. Brown (1978). *The dependence of some strains of Mycobacterium avium on mycobactin for initial and subsequent growth*. J Med Microbiol 11 (1): 53-7.
- McClure, H. M., R. J. Chiodini, D. C. Anderson, R. B. Swenson, W. R. Thayer und J. A. Coutu (1987). *Mycobacterium paratuberculosis infection in a colony of stump-tail macaques (Macaca arctoides)*. J Infect Dis 155 (5): 1011-9.
- McDonald, W. L., S. E. Ridge, A. F. Hope und R. J. Condon (1999). *Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle*. Aust Vet J 77 (2): 113-9.
- McKenna, S. L., H. W. Barkema, G. P. Keefe und D. C. Sockett (2006). *Agreement between three ELISAs for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle*. Vet Microbiol 114 (3-4): 285-91.
- McKenna, S. L., G. P. Keefe, H. W. Barkema und D. C. Sockett (2005). *Evaluation of three ELISAs for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using tissue and fecal culture as comparison standards*. Vet Microbiol 110 (1-2): 105-11.
- McKenna, S. L., D. C. Sockett, G. P. Keefe, J. McClure, J. A. VanLeeuwen und H. W. Barkema (2005). *Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Vet Diagn Invest 17 (5): 463-6.
- McKenzie, R. A. und W. H. Ward (1981). *Rhodococcus (Corynebacterium) equi: a possible cause of reactions to the complement fixation test for Johne's disease of cattle*. Aust Vet J 57 (4): 200-1.
- McNab, W. B., A. H. Meek, J. R. Duncan, B. W. Brooks, A. A. Van Dreumel, S. W. Martin, K. H. Nielsen, E. A. Sugden und C. Turcotte (1991). *An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis*. Can J Vet Res 55 (3): 252-9.
- McNeil, M. R. und P. J. Brennan (1991). *Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information*. Res Microbiol 142 (4): 451-63.
- Merkal, R. S. (1973). *Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis*. J Am Vet Med Assoc 163 (9): 1100-2.
- Mijs, W., P. de Haas, R. Rossau, T. Van der Laan, L. Rigouts, F. Portaels und D. van Soolingen (2002). *Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation Mycobacterium avium subsp. avium for bird-type isolates and 'M. avium subsp. hominissuis' for the human/porcine type of M. avium*. Int J Syst Evol Microbiol 52 (5): 1505-18.
- Millar, D., J. Ford, J. Sanderson, S. Withey, M. Tizard, T. Doran und J. Hermon-Taylor (1996). *IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales*. Appl Environ Microbiol 62 (9): 3446-52.

- Milner, A. R., A. W. Lepper, W. N. Symonds und E. Gruner (1987). *Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with Mycobacterium paratuberculosis after absorption of serum with M phlei*. Res Vet Sci 42 (2): 140-4.
- Milner, A. R., W. N. Mack, K. J. Coates, J. Hill, I. Gill und P. Sheldrick (1990). *The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle*. Vet Microbiol 25 (2-3): 193-8.
- Molla, A. (1978). *Immunoglobulin levels in calves fed colostrum by stomach tube*. Vet Rec 103 (17): 377-80.
- Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann und N. F. Cheville (1988). *Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves*. Vet Pathol 25 (2): 131-7.
- Mond, J. J., A. Lees und C. M. Snapper (1995). *T cell-independent antigens type 2*. Annu Rev Immunol 13: 655-92.
- Monti, P. L. (2006). Serodiagnostik der bovinen *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-Infektion: Vergleich von zwei Testsystemen. Institut für Veterinärbakteriologie. Zürich, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich.
- Moreno, C., A. Mehler und J. Lamb (1988). *The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation*. Clin Exp Immunol 74 (2): 206-10.
- Morin, D. E., G. C. McCoy und W. L. Hurley (1997). *Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves*. J Dairy Sci 80 (4): 747-53.
- Moss, M. T., E. P. Green, M. L. Tizard, Z. P. Malik und J. Hermon-Taylor (1991). *Specific detection of Mycobacterium paratuberculosis by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900*. Gut 32 (4): 395-8.
- Motiwalla, A. S., M. Strother, A. Amonsing, B. Byrum, S. A. Naser, J. R. Stabel, W. P. Shulaw, J. P. Bannantine, V. Kapur und S. Sreevatsan (2003). *Molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis*. J Clin Microbiol 41 (5): 2015-26.
- Mullerad, J., A. H. Hovav, Y. Fishman, R. G. Barletta und H. Bercovier (2002). *Antigenicity of Mycobacterium paratuberculosis superoxide dismutase in mice*. FEMS Immunol Med Microbiol 34 (1): 81-8.
- Mullerad, J., I. Michal, Y. Fishman, A. H. Hovav, R. G. Barletta und H. Bercovier (2002). *The immunogenicity of Mycobacterium paratuberculosis 85B antigen*. Med Microbiol Immunol 190 (4): 179-87.
- Muskens, J., M. H. Mars, A. R. Elbers, K. Van Maanen und D. Bakker (2003). *The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50 (5): 231-4.
- Naser, S. A., G. Ghobrial, C. Romero und J. F. Valentine (2004). *Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease*. Lancet 364 (9439): 1039-44.

- Naser, S. A., K. Hulten, I. Shafran, D. Y. Graham und F. A. El-Zaatari (2000). *Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of M. avium subsp. paratuberculosis*. Vet Microbiol 77 (3-4): 497-504.
- Nebe-von-Caron, G., P. J. Stephens, C. J. Hewitt, J. R. Powell und R. A. Badley (2000). *Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting*. J Microbiol Methods 42 (1): 97-114.
- Nielsen, S. S. und N. Toft (2006). *Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis*. J Dairy Sci 89 (2): 569-79.
- Nielsen, S. S. und N. Toft (2008). *Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques*. Vet Microbiol 129 (3-4): 217-35.
- Nielsen, S. S. und N. Toft (2009). *A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe*. Prev Vet Med 88 (1): 1-14.
- O'Brien, R., C. G. Mackintosh, D. Bakker, M. Kopečna, I. Pavlik und J. F. Griffin (2006). *Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in the red deer (Cervus elaphus)*. Infect Immun 74 (6): 3530-7.
- O'Mahony, J. und C. Hill (2002). *A real time PCR assay for the detection and quantitation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using SYBR Green and the Light Cycler*. J Microbiol Methods 51 (3): 283-93.
- OIE (2009). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.1.11.: 282-3.
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.01.11_PARATB.pdf.
- Olsen, I., L. J. Reitan, G. Holstad und H. G. Wiker (2000). *Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Infect Immun 68 (2): 801-8.
- Olsen, I., L. J. Reitan und H. G. Wiker (2000). *Distinct differences in repertoires of low-molecular-mass secreted antigens of Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 38 (12): 4453-8.
- Olsen, I., M. Tryland, H. G. Wiker und L. J. Reitan (2001). *AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an enzyme-linked immunosorbent assay*. Clin Diagn Lab Immunol 8 (4): 797-801.
- Osterstock, J. B., G. T. Fosgate, B. Norby, E. J. Manning, M. T. Collins und A. J. Roussel (2007). *Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis*. J Am Vet Med Assoc 230 (6): 896-901.
- Ostrowski, M., S. L. Mundo, N. B. Harris, R. G. Barletta und O. J. Lopez (2003). *B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of mycobacterium avium ssp. paratuberculosis recognized by antibodies from infected cattle*. Scand J Immunol 58 (5): 511-21.
- Paustian, M. L., A. Amonsin, V. Kapur und J. P. Bannantine (2004). *Characterization of novel coding sequences specific to Mycobacterium avium subsp.*

- paratuberculosis: implications for diagnosis of Johne's Disease*. J Clin Microbiol 42 (6): 2675-81.
- Pavlik, I., A. Horvathova, L. Dvorska, J. Bartl, P. Svastova, R. du Maine und I. Rychlik (1999). *Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. J Microbiol Methods 38 (1-2): 155-67.
- Pavlik, I., L. Matlova, J. Bartl, P. Svastova, L. Dvorska und R. Whitlock (2000). *Parallel faecal and organ Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis culture of different productivity types of cattle*. Vet Microbiol 77 (3-4): 309-24.
- Peake, P., A. Gooley und W. J. Britton (1993). *Mechanism of interaction of the 85B secreted protein of Mycobacterium bovis with fibronectin*. Infect Immun 61 (11): 4828-34.
- Perez, V., J. Tellechea, J. J. Badiola, M. Gutierrez und J. F. Garcia Marin (1997). *Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis*. Am J Vet Res 58 (8): 799-803.
- Pethe, K., S. Alonso, F. Biet, G. Delogu, M. J. Brennan, C. Locht und F. D. Menozzi (2001). *The heparin-binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination*. Nature 412 (6843): 190-4.
- Pheiffer, C., J. Betts, P. Lukey und P. van Helden (2002). *Protein expression in Mycobacterium tuberculosis differs with growth stage and strain type*. Clin Chem Lab Med 40 (9): 869-75.
- Pinedo, P. J., C. D. Buergelt, G. A. Donovan, P. Melendez, L. Morel, R. Wu, T. Y. Langae und D. O. Rae (2008). *Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle*. Vet Microbiol.
- Poupart, P., M. Coene, H. Van Heuverswyn und C. Cocito (1993). *Preparation of a specific RNA probe for detection of Mycobacterium paratuberculosis and diagnosis of Johne's disease*. J Clin Microbiol 31 (6): 1601-5.
- Prado, M. E., T. M. Prado, M. Payton und A. W. Confer (2006). *Maternally and naturally acquired antibodies to Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves*. Vet Immunol Immunopathol 111 (3-4): 301-7.
- Rankin, J. D. (1962). *The experimental infection of cattle with Mycobacterium johnei*. IV. *Adult cattle maintained in an infectious environment*. J Comp Pathol 72: 113-7.
- Raynaud, C., G. Etienne, P. Peyron, M. A. Laneelle und M. Daffe (1998). *Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology 144 (2): 577-87.
- Reichel, M. P., R. Kittelberger, M. E. Penrose, R. M. Meynell, D. Cousins, T. Ellis, L. M. Mutharia, E. A. Sugden, A. H. Johns und G. W. de Lisle (1999). *Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle and analysis of the antigens involved*. Vet Microbiol 66 (2): 135-50.
- Ridge, S. E., I. R. Morgan, D. C. Sockett, M. T. Collins, R. J. Condrón, N. W. Skilbeck und J. J. Webber (1991). *Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle*. Aust Vet J 68 (8): 253-7.

- Riviere, M., G. Puzo, E. L. Wright und W. W. Barrow (1996). *A unique phenylalanine-containing lipopeptide isolated from a rough-colony variant of Mycobacterium avium*. Eur J Biochem 241 (2): 682-90.
- Robbe-Austerman, S., J. R. Stabel und D. G. Morrical (2007). *Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis organisms*. J Vet Diagn Invest 19 (1): 88-90.
- Rohde, R. F. und W. P. Shulaw (1990). *Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis*. J Am Vet Med Assoc 197 (11): 1482-3.
- Rojas, R. E. und A. Segal-Eiras (1996). *Immunoglobulin G response against 10-kDa and 65-kDa heat-shock proteins in leprosy patients and their household contacts*. FEMS Immunol Med Microbiol 15 (4): 189-98.
- Rosenfeld, G. und B. Bressler (2011). *Mycobacterium avium paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective*. Can J Gastroenterol 24 (10): 619-24.
- Rosseels, V., S. Marche, V. Roupie, M. Govaerts, J. Godfroid, K. Walravens und K. Huygen (2006). *Members of the 30- to 32-kilodalton mycolyl transferase family (Ag85) from culture filtrate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis are immunodominant Th1-type antigens recognized early upon infection in mice and cattle*. Infect Immun 74 (1): 202-12.
- Roussel, A. J., G. T. Fosgate, E. J. Manning und M. T. Collins (2007). *Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds*. J Am Vet Med Assoc 230 (6): 890-5.
- Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, M. Tsukamura, F. Kuze und K. Asano (1989). *Identification and partial characterization of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare by using DNA probes*. J Clin Microbiol 27 (5): 994-7.
- Saxegaard, F. (1990). *Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of Mycobacterium paratuberculosis*. J Comp Pathol 102 (2): 149-56.
- Seitz, S. E., L. E. Heider, W. D. Heuston, S. Bech-Nielsen, D. M. Rings und L. Spangler (1989). *Bovine fetal infection with Mycobacterium paratuberculosis*. J Am Vet Med Assoc 194 (10): 1423-6.
- Semret, M., D. Bakker, N. Smart, I. Olsen, K. Haslov und M. A. Behr (2006). *Genetic analysis of Mycobacterium avium complex strains used for producing purified protein derivatives*. Clin Vaccine Immunol 13 (9): 991-6.
- Shannon, J. G., D. C. Cockrell, K. Takahashi, G. L. Stahl und R. A. Heinzen (2009). *Antibody-mediated immunity to the obligate intracellular bacterial pathogen Coxiella burnetii is Fc receptor- and complement-independent*. BMC Immunol 10: 26.
- Sherman, D. M., B. Bray, J. M. Gay und F. Bates (1989). *Evaluation of the agar gel immunodiffusion test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle*. Am J Vet Res 50 (4): 525-30.

- Sherman, D. M., J. M. Gay, D. S. Bouley und G. H. Nelson (1990). *Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis*. Am J Vet Res 51 (3): 461-5.
- Sherman, D. M., R. J. Markham und F. Bates (1984). *Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle*. J Am Vet Med Assoc 185 (2): 179-82.
- Sherman, D. R., P. J. Sabo, M. J. Hickey, T. M. Arain, G. G. Mahairas, Y. Yuan, C. E. Barry, 3rd und C. K. Stover (1995). *Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (14): 6625-9.
- Shin, S. J., C. F. Chang, C. D. Chang, S. P. McDonough, B. Thompson, H. S. Yoo und Y. F. Chang (2005). *In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Infect Immun 73 (8): 5074-85.
- Shin, S. J., D. Cho und M. T. Collins (2008). *Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Clin Vaccine Immunol 15 (8): 1277-81.
- Shin, S. J., H. S. Yoo, S. P. McDonough und Y. F. Chang (2004). *Comparative antibody response of five recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35 kDa antigen for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Vet Sci 5 (2): 111-7.
- Shinnick, T. M. (1987). *The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 169 (3): 1080-8.
- Shulaw, W. P., S. Bech-Nielsen, D. M. Rings, D. M. Getzy und T. S. Woodruff (1993). *Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion*. Am J Vet Res 54 (1): 13-9.
- Sibley, L. D., S. W. Hunter, P. J. Brennan und J. L. Krahenbuhl (1988). *Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages*. Infect Immun 56 (5): 1232-6.
- Signaturethardottir, O. G., M. Valheim und C. M. Press (2004). *Establishment of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants*. Adv Drug Deliv Rev 56 (6): 819-34.
- Singh, S. und K. Gopinath (2011). *Mycobacterium avium subspecies Paratuberculosis and Crohn's Regional Ileitis: How Strong is Association?* J Lab Physicians 3 (2): 69-74.
- Snapper, C. M. und W. E. Paul (1987). *Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production*. Science 236 (4804): 944-7.
- Sockett, D. C., T. A. Conrad, C. B. Thomas und M. T. Collins (1992). *Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis*. J Clin Microbiol 30 (5): 1134-9.
- Sohal, J. S., S. V. Singh, P. Tyagi, S. Subhodh, P. K. Singh, A. V. Singh, K. Narayanasamy, N. Sheoran und K. Singh Sandhu (2008). *Immunology of mycobacterial infections: with special reference to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Immunobiology 213 (7): 585-98.

- Speer, C. A., M. C. Scott, J. P. Bannantine, W. R. Waters, Y. Mori, R. H. Whitlock und S. Eda (2006). *A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infections (Johne's Disease) in cattle*. Clin Vaccine Immunol 13 (5): 535-40.
- Stabel, J. R. (2000a). *Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 61 (7): 754-60.
- Stabel, J. R. (2000b). *Transitions in immune responses to Mycobacterium paratuberculosis*. Vet Microbiol 77 (3-4): 465-73.
- Stabel, J. R. und J. P. Goff (2004). *Efficacy of immunologic assays for the detection of Johne's disease in dairy cows fed additional energy during the periparturient period*. J Vet Diagn Invest 16 (5): 412-20.
- Stabel, J. R. und M. S. Khalifeh (2008). *Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Vet Immunol Immunopathol 126 (3-4): 211-9.
- Stabel, J. R., M. V. Palmer und R. H. Whitlock (2003). *Immune responses after oral inoculation of weanling bison or beef calves with a bison or cattle isolate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Wildl Dis 39 (3): 545-55.
- Stabel, J. R., S. J. Wells und B. A. Wagner (2002). *Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds*. J Dairy Sci 85 (3): 525-31.
- Stabel, J. R. und R. H. Whitlock (2001). *An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds*. Vet Immunol Immunopathol 79 (1-2): 69-81.
- Stahl, D. A. und J. W. Urbance (1990). *The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria*. J Bacteriol 172 (1): 116-24.
- Stevenson, K., V. M. Hughes, L. de Juan, N. F. Inglis, F. Wright und J. M. Sharp (2002). *Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J Clin Microbiol 40 (5): 1798-804.
- Stewart, D. J., J. A. Vaughan, P. L. Stiles, P. J. Noske, M. L. Tizard, S. J. Prowse, W. P. Michalski, K. L. Butler und S. L. Jones (2007). *A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats*. Vet Microbiol 122 (1-2): 83-96.
- Stott, G. H., D. B. Marx, B. E. Menefee und G. T. Nightengale (1979). *Colostrum immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption*. J Dairy Sci 62 (10): 1632-8.
- Stottmeier, K. D., R. E. Beam und G. P. Kubica (1969). *Purified protoplasmic peptides of mycobacteria: in vivo and in vitro comparison of the species specificity of purified protoplasmic peptides and purified protein derivatives of mycobacterial culture filtrates*. J Bacteriol 100 (1): 201-8.

- Streeter, R. N., G. F. Hoffsis, S. Bech-Nielsen, W. P. Shulaw und D. M. Rings (1995). *Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows*. Am J Vet Res 56 (10): 1322-4.
- Strommenger, B., K. Stevenson und G. F. Gerlach (2001). *Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 196 (1): 31-7.
- Sugden, E. A., B. S. Samagh, D. R. Bundle und J. R. Duncan (1987). *Lipoarabinomannan and lipid-free arabinomannan antigens of Mycobacterium paratuberculosis*. Infect Immun 55 (3): 762-70.
- Sung, N., K. Takayama und M. T. Collins (2004). *Possible association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of Mycobacterium paratuberculosis*. Appl Environ Microbiol 70 (3): 1688-97.
- Sweeney, R. W., J. Uzonna, R. H. Whitlock, P. L. Habecker, P. Chilton und P. Scott (2006). *Tissue predilection sites and effect of dose on Mycobacterium avium subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model*. Res Vet Sci 80 (3): 253-9.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, C. L. Buckley und P. A. Spencer (1995). *Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle*. J Vet Diagn Invest 7 (4): 488-93.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock und A. E. Rosenberger (1992). *Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows*. J Clin Microbiol 30 (1): 166-71.
- Swets, J. A. (1988). *Measuring the accuracy of diagnostic systems*. Science 240 (4857): 1285-93.
- Taylor, T. K., C. R. Wilks und D. S. McQueen (1981). *Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from the milk of a cow with Johne's disease*. Vet Rec 109 (24): 532-3.
- Teitelbaum, R., A. Glatman-Freedman, B. Chen, J. B. Robbins, E. Unanue, A. Casadevall und B. R. Bloom (1998). *A mAb recognizing a surface antigen of Mycobacterium tuberculosis enhances host survival*. Proc Natl Acad Sci U S A 95 (26): 15688-93.
- Thole, J. E., W. C. van Schooten, W. J. Keulen, P. W. Hermans, A. A. Janson, R. R. de Vries, A. H. Kolk und J. D. van Embden (1988). *Use of recombinant antigens expressed in Escherichia coli K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65-kilodalton protein of Mycobacterium bovis BCG*. Infect Immun 56 (6): 1633-40.
- Thorel, M. F. (1984). *Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species*. Ann Rech Vet 15 (3): 405-9.
- Thorel, M. F., M. Krichevsky und V. V. Levy-Frebault (1990). *Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of Mycobacterium avium, and description of Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov., Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov., and Mycobacterium avium subsp. silvaticum subsp. nov.* Int J Syst Bacteriol 40 (3): 254-60.

- Tiwari, A., J. A. VanLeeuwen, I. R. Dohoo, H. Stryhn, G. P. Keefe und J. P. Haddad (2005). *Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum on culling in dairy cattle in four Canadian provinces*. Vet Microbiol 109 (3-4): 147-58.
- Tiwari, A., J. A. VanLeeuwen, S. L. McKenna, G. P. Keefe und H. W. Barkema (2006). *Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds*. Can Vet J 47 (9): 874-82.
- Tizard, I. R. (2009). *Veterinary Immunology - An Introduction*. St. Louis, Missouri, Saunders Elsevier.
- Tizard, M. L., M. T. Moss, J. D. Sanderson, B. M. Austen und J. Hermon-Taylor (1992). *p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in Mycobacterium paratuberculosis*. J Gen Microbiol 138 Pt 8: 1729-36.
- Tlaskalova-Hogenova, H., L. Mandel, R. Stepankova, J. Bartova, R. Barot, M. Leclerc, F. Kovaru und I. Trebichavsky (1992). *Autoimmunity: from physiology to pathology. Natural antibodies, mucosal immunity and development of B cell repertoire*. Folia Biol (Praha) 38 (3-4): 202-15.
- Tooker, B. C., J. L. Burton und P. M. Coussens (2002). *Survival tactics of M. paratuberculosis in bovine macrophage cells*. Vet Immunol Immunopathol 87 (3-4): 429-37.
- Triccas, J. A., P. W. Roche, N. Winter, C. G. Feng, C. R. Butlin und W. J. Britton (1996). *A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to Mycobacterium leprae*. Infect Immun 64 (12): 5171-7.
- Trigona, W. L., A. Hirano, W. C. Brown und D. M. Estes (1999). *Immunoregulatory roles of interleukin-13 in cattle*. J Interferon Cytokine Res 19 (11): 1317-24.
- Tuci, A., F. Tonon, L. Castellani, A. Sartini, G. Roda, M. Marocchi, A. Caponi, A. Munarini, G. Rosati, G. Ugolini, L. Fuccio, M. Scagliarini, F. Bazzoli und A. Belluzzi (2011). *Fecal detection of Mycobacterium avium paratuberculosis using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects*. Dig Dis Sci 56 (10): 2957-62.
- Turenne, C. Y., D. M. Collins, D. C. Alexander und M. A. Behr (2008). *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and M. avium subsp. avium are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of M. avium organisms*. J Bacteriol 190 (7): 2479-87.
- Turenne, C. Y., M. Semret, D. V. Cousins, D. M. Collins und M. A. Behr (2006). *Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the Mycobacterium avium complex*. J Clin Microbiol 44 (2): 433-40.
- Uzonna, J. E., P. Chilton, R. H. Whitlock, P. L. Habecker, P. Scott und R. W. Sweeney (2003). *Efficacy of commercial and field-strain Mycobacterium paratuberculosis vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model*. Vaccine 21 (23): 3101-9.
- van Schaik, G., C. R. Rossiter, S. M. Stehman, S. J. Shin und Y. H. Schukken (2003). *Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in commercial dairy herds*. Am J Vet Res 64 (4): 479-84.

- Vannuffel, P., P. Gilot, B. Limbourg, B. Naerhuyzen, C. Dieterich, M. Coene, L. Machtelinckx und C. Cocito (1994). *Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle*. J Clin Microbiol 32 (5): 1211-6.
- Vansnick, E., P. De Rijk, F. Vercammen, D. Geysen, L. Rigouts und F. Portaels (2004). *Newly developed primers for the detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Vet Microbiol 100 (3-4): 197-204.
- Vary, P. H., P. R. Andersen, E. Green, J. Hermon-Taylor und J. J. McFadden (1990). *Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium paratuberculosis in Johne's disease*. J Clin Microbiol 28 (5): 933-7.
- Villeneuve, C., G. Etienne, V. Abadie, H. Montrozier, C. Bordier, F. Laval, M. Daffe, I. Maridonneau-Parini und C. Astarie-Dequeker (2003). *Surface-exposed glycopeptidolipids of Mycobacterium smegmatis specifically inhibit the phagocytosis of mycobacteria by human macrophages. Identification of a novel family of glycopeptidolipids*. J Biol Chem 278 (51): 51291-300.
- Vitour, D., J. Guillotin, C. Sailleau, C. Viarouge, A. Desprat, F. Wolff, G. Belbis, B. Durand, L. Bakkali-Kassimi, E. Breard, S. Zientara und G. Zanella (2011). *Colostrum antibody induced interference of inactivated bluetongue serotype-8 vaccines in calves*. Vet Res 42 (1): 18.
- Vordermeier, H. M., N. Venkataprasad, D. P. Harris und J. Ivanyi (1996). *Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice*. Clin Exp Immunol 106 (2): 312-6.
- Waters, W. R., J. M. Miller, M. V. Palmer, J. R. Stabel, D. E. Jones, K. A. Koistinen, E. M. Steadham, M. J. Hamilton, W. C. Davis und J. P. Bannantine (2003). *Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection of calves*. Infect Immun 71 (9): 5130-8.
- Waters, W. R., J. R. Stabel, R. E. Sacco, J. A. Harp, B. A. Pesch und M. J. Wannemuehler (1999). *Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection of cattle*. Infect Immun 67 (4): 1593-8.
- Weigoldt, M., J. Meens, K. Doll, I. Fritsch, P. Mobius, R. Goethe und G. F. Gerlach (2011). *Differential proteome analysis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis grown in vitro and isolated from cases of clinical Johne's disease*. Microbiology 157 (Pt 2): 557-65.
- Weiss, D. J., O. A. Evanson und C. D. Souza (2006). *Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease*. Vet Pathol 43 (2): 127-35.
- Whitlock, R. H. und C. Buergelt (1996). *Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology)*. Vet Clin North Am Food Anim Pract 12 (2): 345-56.
- Whitlock, R. H., Rosenberger, A.E., Sweeney, R.W., Spencer, P.A. (1996). *Distribution of M. paratuberculosis in tissues of cattle from herds infected with Johne's disease*. In: Proceedings of the Fifth International Colloquium on Paratuberculosis, Madison, WI: 242-249.

- Whitlock, R. H., S. J. Wells, R. W. Sweeney und J. Van Tiem (2000). *ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method*. Vet Microbiol 77 (3-4): 387-98.
- Whittington, R. J. und E. S. Sergeant (2001). *Progress towards understanding the spread, detection and control of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in animal populations*. Aust Vet J 79 (4): 267-78.
- Whittington, R. J. und P. A. Windsor (2007). *In utero infection of cattle with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: A critical review and meta-analysis*. Vet J.
- Wiker, H. G. und M. Harboe (1992). *The antigen 85 complex: a major secretion product of Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol Rev 56 (4): 648-61.
- Wilks, C. R., T. K. Taylor, E. G. Russell und T. R. Thomas (1981). *Isolation of mycobacteria inducing cross-reactions in the complement fixation test for Johne's disease*. Res Vet Sci 30 (3): 323-7.
- Williams, A., R. Reljic, I. Naylor, S. O. Clark, G. Falero-Diaz, M. Singh, S. Challacombe, P. D. Marsh und J. Ivanyi (2004). *Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs*. Immunology 111 (3): 328-33.
- Windsor, P. A. und R. J. Whittington (2009). *Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease*. Vet J.
- Winter, N., J. A. Triccas, B. Rivoire, M. C. Pessolani, K. Eiglmeier, E. M. Lim, S. W. Hunter, P. J. Brennan und W. J. Britton (1995). *Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of Mycobacterium leprae*. Mol Microbiol 16 (5): 865-76.
- Wu, C. W., M. Livesey, S. K. Schmoller, E. J. Manning, H. Steinberg, W. C. Davis, M. J. Hamilton und A. M. Talaat (2007). *Invasion and persistence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis during early stages of Johne's disease in calves*. Infect Immun 75 (5): 2110-9.
- Yarnall, M. und L. B. Corbeil (1989). *Antibody response to Haemophilus somnus Fc receptor*. J Clin Microbiol 27 (1): 111-7.
- Yokomizo, Y., R. S. Merkal und P. A. Lyle (1983). *Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 44 (11): 2205-7.
- Yokomizo, Y., H. Yugi und R. S. Merkal (1985). *A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis*. Nippon Juigaku Zasshi 47 (1): 111-9.
- Yuan, Y., D. D. Crane und C. E. Barry, 3rd (1996). *Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog*. J Bacteriol 178 (15): 4484-92.
- Zhao, Y., S. M. Jackson und R. Aitken (2006). *The bovine antibody repertoire*. Dev Comp Immunol 30 (1-2): 175-86.

IX Anhang

1 Reagenzien und Materialien

Tabelle 22: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Materialien

Reagenz / Artikel	Bezugsquelle	Artikelnummer
Blut-Agar (Basis)	Merck KGaA, Darmstadt	1.10886
Cattletype® MAP Ab ELISA	Labor Diagnostik GmbH, Leipzig	03-501/1
CryoTubes™ (1,5 ml)	Thermo Fisher Scientific, über Nunc GmbH & Co.KG, Langenselbold	368632
Deckgläschen (18 x 18 mm)	Menzel-Gläser , über MAGV GmbH, Rabenau	-
Dubos Oleic Albumin Complex	Becton Dickinson, Heidelberg	212240
Einmal-Sterilfilter (0,22 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	P 6661
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt	1.00983
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht	55.1579.002
Finntip® 250 Universal (0,5- 250 µl)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold	9400230
Glasfläschchen mit Schraubverschluss	über MAGV GmbH, Rabenau	1201906220
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt	8.18709.1000
HEPES	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg	5288
Herrold's Egg Yolk Agar	Becton Dickinson, Heidelberg	222232
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt	1.09634.2511
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	4873

Fortsetzung der **Tabelle 22** auf der nächsten Seite

Tabelle 22 (Fortsetzung)

Reagenz / Artikel	Bezugsquelle	Artikelnummer
Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	L34856
Microwell-Platten, 96 Loch, V-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	651101
Middlebrook 7H9 Broth	Difco, Kansas, USA; über Becton Dickinson, Heidelberg	271310
Middlebrook 7H10-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg	295964
Mycobactin J	Allied Monitor, Inc., Missouri, USA	62-0002
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3957.2
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	6345
Objektträger, geschnitten	IDL, Nidderau, über MAGV GmbH, Rabenau	3872872
Photometereinmalküvetten	Nerbe plus GmbH, Winsen-Luhe	06-011-0200
Pipettenspitzen blau (100- 100 µl)	Ratiolab GmbH, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen gelb (10- 100 µl)	Ratiolab GmbH, Dreieich	2100601
Pipettenspitzen kristall (0,5- 10 µl)	Ratiolab GmbH, Dreieich	968704
Polystyrene Round-Bottom- Tubes (5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg	352052
Polypropylenröhrchen CELLSTAR® (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	188261
Polypropylenröhrchen CELLSTAR® (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	227261

Fortsetzung der **Tabelle 22** auf der nächsten Seite

Tabelle 22 (Fortsetzung)

Reagenz / Artikel	Bezugsquelle	Artikelnummer
Pourquier®-ELISA paratuberculosis (5 plates kits for 240 reactions)	Institut Pourquier, Montpellier, France, ab 2008 über IDEXX GmbH, Ludwigsburg	P07110
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Labor Diagnostik GmbH, Leipzig	0030120.086
Reaktionsgefäß (2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg	0030120.094
Schaf anti-Rind IgG- Antikörper, FITC-konjugiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI23F
Schaf anti-Rind IgG ₁ - Antikörper, FITC-konjugiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI21F
Schaf anti-Rind IgG ₂ - Antikörper, FITC-konjugiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI22F
Schaf anti-Rind IgM- Antikörper, FITC-konjugiert	AbD Serotec, Düsseldorf	AAI19F
Serumröhrchen (10 ml)	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth	07125
Superblockpuffer in PBS	Perbio Science Deutschland, Bonn Deutschland	0037515
Svanovir® Para-Tb ELISA (2 Platten)	Svanova, Schweden über Labor Diagnostik GmbH, Leipzig	10-2900-02
Svanovir® Para-Tb ELISA (10 Platten)	Svanova, Schweden über Labor Diagnostik GmbH, Leipzig	10-2900-10
Tween 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	P8074

2 Puffer, Medien und Lösungen

HEPES-10-fach-Konzentrat (pH 7,4)

NaCl	40,0 g
KCl	1,5 g
HEPES	11,9 g
D-Glucose (wasserfrei)	10,0 g
A. bidest.	ad 500 ml

HEPES-Puffer (pH 7,4)

HEPES-10-fach-Konzentrat	50 ml
A. bidest.	ad 500 ml

Löwenstein-Jensen-Schrägagar

KH_2PO_4	2,5 g
MgSO_2	0,2 g
Magnesiumcitrat	0,6 g
L-Asparagin	3,6 g
Kartoffelmehl	30,0 g
Malachitgrün	0,4 g
Glycerin	12,0 ml
frische Eier	20 Stück
A. bidest.	ad 600 ml

Middlebrook 7H9-Medium

Middlebrook 7H9 Broth	4,7 g
Tween 80	0,5 g
Mycobactin J	2,0 mg
A. bidest.	900 ml
Dubos Oleic Albumin Complex	100 ml

Middlebrook 7H10-Agar-Platten:

Middlebrook 7H10 Agar	19,0 g
Glycerin	5,0 ml
Dubos Oleic Albumin Complex	100,0 ml
Mycobactin J	2,0 mg
A. bidest.	900,0 ml

NaCl-Lösung (0,89 %)

NaCl	8,9 g
A. bidest.	ad 1000 ml

PBS-Puffer (pH 7,4)

PBS-10-fach-Konzentrat	100,0 ml
A. bidest.	ad 1000 ml

PBS-10-fach-Konzentrat (pH 7,4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	18,0 g
KH_2PO_4	2,5 g
KCl	2,5 g
NaCl	100,0 g
A. bidest.	ad 1000 ml

Puffer A:

Tween 80	0,5 ml
Superblock-Puffer in PBS	100,0 ml
PBS-Puffer	ad 1000 ml

Schafblut-Agar

Blut-Agar (Basis)	5 % (w/v)
defibriniertes Schafblut	5 % (v/v)

3 Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank Typ BB 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Eismaschine Scotsman AF 80AS	Scotsman Icesystems, Vernon Hills, USA
FACSCalibur™-Gerät	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage AE 163	Mettler-Waagen, Gießen
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RB	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Gefrierschrank -20° HU GSD2614/01	Bosch, Jungingen
Gefrierschrank -70° HU 9-50 V-T-A	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mehrkanalpipette FINNPIPETTE®	Thermo Fisher Scientific, Hamburg
Multistepper	Labsystems GmbH, Meckenheim
Photometer DU® 640	Beckman Instruments, München
Plattenphotometer Titertek Multiscan Ascent	Labsystems GmbH, Meckenheim
Plattenzentrifuge Centrifuge® 5403	Eppendorf Vertrieb Deutschland, GmbH
Schüttelinkubator TITRAMAX® 100	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Schwenktisch 3015	Frimont S.P.A., Mailand , Italien
Sicherheitswerkbank Gelaire Lamina Air Flow Class 100	ICN Biomedics, Italien
Tischkühlzentrifuge 4K15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Tischzentrifuge Rotina 35	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Ultraschallwasserbad Laboson 200	Bender & Hobein GmbH Labortechnik, Bruchsal
Waschmaschine ELISA Costar®Transtar96	Corning, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Immunogene Proteine von MAP (Auswahl).....	18
Tabelle 2:	In Deutschland eingesetzte ELISA-Verfahren	31
Tabelle 3:	Sensitivität und Spezifität verschiedener kommerziell erhältlicher ELISA-Systeme (Kotkultur als Goldstandard)	32
Tabelle 4:	Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	34
Tabelle 5:	Übersicht über die Rinderbetriebe	38
Tabelle 6:	Auflistung der in der Kontroll- und der Infektionsgruppe verwendeten Kälber	40
Tabelle 7:	Tierdaten der Rinder aus den Kohortenstudien.....	42
Tabelle 8:	Übersicht über die 3 verwendeten kommerziell erhältlichen ELISAs	56
Tabelle 9:	Übersicht über die in den DFZM-Ak-Testvarianten verwendeten Sekundärantikörper	62
Tabelle 10:	Bestimmung der optimalen Konzentration der Präadsorptions antigene MAA und MP	72
Tabelle 11:	Bestimmung der optimalen Konzentration der Testantigene MAP und MAA	73
Tabelle 12:	Nachweis der MAP-Infektion bei Kühen mittels Svanovir [®] -, Cattletype [®] -ELISA und DFZM-IgG ₁ -Test im Vergleich zur kulturell- bakteriologischen Untersuchung (Goldstandard-Test).....	81
Tabelle 13:	Ergebnis der durchflusszytometrischen Lebendkeimzahl-Bestim- mung in Bakteriensuspensionen mittels LIVE/DEAD [®] BacLight™-Kit...	84
Tabelle 14:	Bestimmung der an die Kälber verabreichten MAP-Keimzahlen	88
Tabelle 15:	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der Muttertiere	89
Tabelle 16:	Signifikanzwerte für die Faktoren Zeit und Gruppe in der zweifakto- riellen Varianzanalyse nach Greenhouse-Geissner	95
Tabelle 17:	Signifikanzwerte des Mittelwertvergleichs zwischen der Kontroll- und der Infektionsgruppe mit dem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben.....	96
Tabelle 18:	Festlegung der Cut Off-Werte für die DFZM-Ak-Testvarianten und den Pourquier [®] -ELISA.....	97
Tabelle 19:	Ergebnisse der kulturell-bakteriologischen und molekularbiologi- schen Untersuchung von Gewebeproben der Kälber der Infektions- gruppe auf MAP (Ergebnisse aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig Universität, Gießen)	106

Tabelle 20:	Ergebnisse der serologischen Untersuchung (Pourquier®-ELISA, DFZM-IgG- und DFZM-IgG ₁ -Test) sowie der Kotuntersuchung (Kultur/PCR) von Muttertieren in der Kohortenstudie 1	109
Tabelle 21:	Publizierte tierexperimentelle Untersuchungen zur humoralen Immunantwort von Kälbern bei MAP-Infektionen. Die Tabelle listet nur experimentelle Studien seit 1990 auf.....	135
Tabelle 22:	Übersicht der verwendeten Reagenzien und Materialien	173

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Algorithmus zur Identifizierung MAP-unverdächtiger Betriebe.....	37
Abbildung 2:	Beprobungsschema in der experimentellen Infektionsstudie.....	45
Abbildung 3:	Koloniemorphologie des MAP K10-Stammes auf Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM)-Agar	48
Abbildung 4:	Koloniemorphologie der Stämme ATCC 43239 (MP), ATCC 19981 (<i>M. scrofulaceum</i>) und ATCC 25291 (MAA) auf Löwenstein- Jensen-Schrägagar nach 4-wöchiger Inkubation bei 37 °C	48
Abbildung 5:	Gating-Strategie bei der LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse im Durchflusszytometer am Beispiel von MAP-Bakterien.....	51
Abbildung 6:	Schema zur Herstellung der MAP-haltigen Inokula für Kälber der Infektionsgruppe	55
Abbildung 7:	Gating-Strategie bei den DFZM-Ak-Tests (Beispiel).....	64
Abbildung 8:	Anteil der im Svanovir®- bzw. Pourquier®-ELISA positiven Reagen- ten unter den weiblichen Rindern im Alter von über 24 Lebens- monate in 8 vorherichtlich MAP-unverdächtigen Betrieben (Erstuntersuchung)	67
Abbildung 9:	Anteil der im Svanovir®- bzw. Pourquier®-ELISA positiven Rinder in der Erst- und Zweituntersuchung	68
Abbildung 10:	Nachweis der Antigenität von MAP-K10-Bakterien in Abhängig- keit von ihrer Wachstumsphase	70
Abbildung 11:	Vergleich von 3 verschiedenen Methoden zur Titerberechnung in den DFZM-Ak-Testvarianten (ROC-Analyse)	76
Abbildung 12:	Vergleich von 3 Methoden zur Präadsorption der Serumproben in den DFZM-Ak-Testvarianten (ROC-Analyse)	77
Abbildung 13:	Vergleich der Sensitivität und Spezifität der 3 DFZM-Ak-Testva- rianten (MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3) mittels ROC-Analyse	79
Abbildung 14:	Vergleich der Sensitivität und Spezifität des DFZM-IgG ₁ -Tests (MP-Präadsorption, DFZM-Titer-3) mit 3 kommerziellen ELISAs mittels ROC-Analyse.....	80
Abbildung 15:	Durchflusszytometrische Analyse von MAP- und <i>E. coli</i> - Bakterienzellen	83
Abbildung 16:	Darstellung einer nach dem Protokoll des LIVE/DEAD® Bac Light™-Kit gefärbten MAP-Suspension im Fluoreszenzmikroskop...	83

Abbildung 17:	Korrelationen zwischen den mittels LIVE/DEAD® BacLight™-Analyse und den mittels OD ₆₆₀ -Messung sowie Oberflächenverfahren in MAP-Suspensionen (n = 12) ermittelten Keimzahlen ...	86
Abbildung 18:	DFZM-Titer-3 bei den Kälbern der Infektions- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Präadsorption der Serumproben	93
Abbildung 19:	DFZM-Titer-3 bei den Kälber der Infektions- und der Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der DFZM-Ak-Testvariante	94
Abbildung 20:	Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei MAP-infizierten Kälbern und Kontrollkälbern	101
Abbildung 21:	Pourquier®-Titer der MAP-infizierten Kälber und der nicht-infizierten Kontrollkälber	103
Abbildung 22:	Dynamik des Pourquier®-Titers bei MAP-infizierten Kälbern und Kontrollkälbern	104
Abbildung 23:	Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei Kälbern eines MAP-Problembetriebes (Kohortenstudie 1)	110
Abbildung 24:	Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei Kälbern eines MAP-Problembetriebes	111
Abbildung 25:	Dynamik der MAP-spezifischen Antikörpertiter bei Kälbern eines MAP-Problembetriebes	112
Abbildung 26:	DFZM-Titer-3 bzw. Pourquier®-Titer bei Jungrindern aus einem MAP-Problembetrieb und einem MAP-unverdächtigen Betrieb in Abhängigkeit zum Lebensalter	116
Abbildung 27:	Nachweis einer MAP-spezifischen Serokonversion bei Jung rindern eines MAP-Problembetriebes und eines MAP-unverdächti gen Betriebes mit dem DFZM-IgG-Test	117
Abbildung 28:	Nachweis einer MAP-spezifischen Serokonversion bei Jungrindern eines MAP-Problembetriebes und eines MAP-unverdächti gen Betriebes mit dem DFZM-IgG ₁ -Test	118

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen und ohne deren Unterstützung und Beistand die Durchführung nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rolf Bauerfeind. Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung des Promotionsvorhabens. Seine Ideen und Anregungen haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Herrn Philip Bridger, Ph.D., danke ich für seine aufopferungsvolle fachliche Unterstützung, die vielen konstruktiven Diskussionen und sein persönliches Engagement, das weit über das übliche Maß hinausging. Bei Herrn Hakan Bulun möchte ich mich für die gemeinsame „MAP-Zeit“ sowie für das Abzentrifugieren zahlreicher Serumproben am Wochenende bedanken.

Herrn Prof. Dr. Christian Menge danke ich für seine stets freundliche fachliche Unterstützung meiner Arbeit. Bei Frau Dr. Stefanie Barth möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Einführung in die ELISA-Technik sowie für die Beantwortung zahlreicher Fragen rund um die Doktorarbeit bedanken. Frau Gabriele Köpf danke ich für ihre Unterstützung im Labor, insbesondere bei der Herstellung der Inokula. Frau Ursula Leidner war mir eine sehr große Hilfe bei der Untersuchung der Serumproben im Pourquier®-ELISA.

Des Weiteren danke ich den anderen Kolleginnen und Kollegen im MAP-Verbundprojekt, namentlich Herrn Prof. Klaus Doll und Herrn Dr. Torsten Seeger aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine sowie Herrn Prof. Michael Bülte, Herrn Dr. Ömer Akineden und Frau Marta Fischer aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der JLU Gießen, für die gute Zusammenarbeit über die gesamte Laufzeit des Vorhabens.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich dafür, dass ich diese Doktorarbeit in einem so angenehmen Arbeitsklima und unter so guten Rahmenbedingungen durchführen durfte. Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut, insbesondere meinen Mit-Doktoranden, die alle zu meiner Freude und Motivation an dieser Arbeit beigetragen haben.

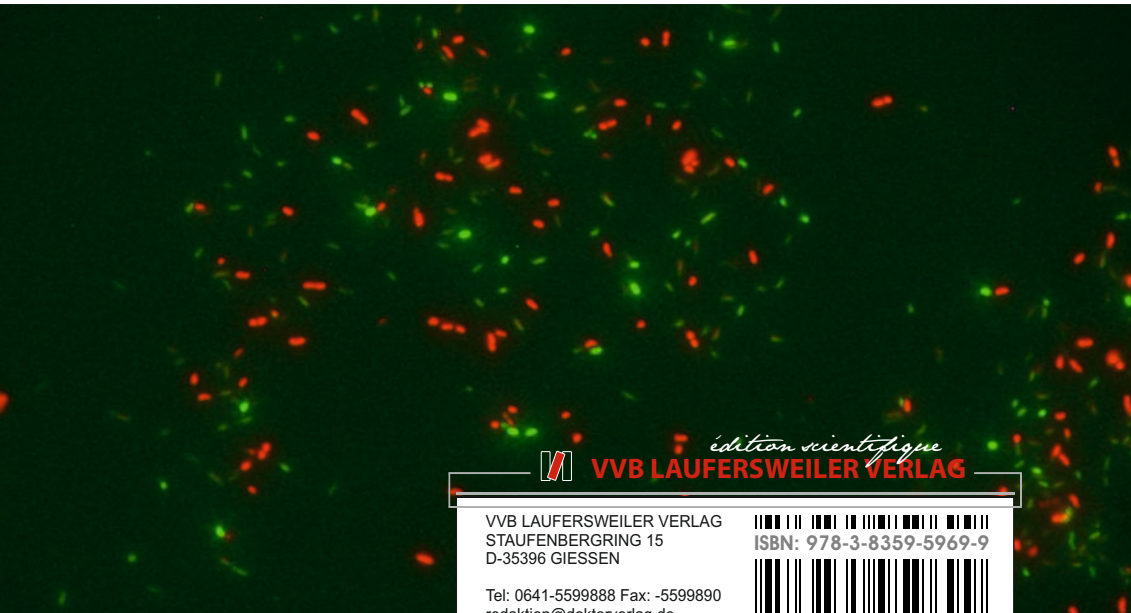
Der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Für ihre Aufgeschlossenheit gegenüber wissenschaftlicher Arbeit sowie ihre stets bereitwillige und gute Zusammenarbeit bei der Gewinnung

des Probenmaterials danke ich den Betriebsleitern und Mitarbeitern der in dieser Arbeit untersuchten Milchviehbetriebe.

Zum Schluss möchte ich meiner Mutter, Ursula Schillinger danken, die mir das Studium und die Doktorarbeit erst ermöglicht hat und mich während dieser Zeit nach besten Kräften unterstützt hat. Bei Martin bedanke ich mich für seine Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen, dem seelischen Beistand und seine Geduld während der gesamten Zeit.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus -Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Simone Schillinger



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5969-9

